



# Insulinorésistance musculaire induite par les céramides : étude des mécanismes d'action et de l'implication du transporteur CERT

Rana Mahfouz

## ► To cite this version:

Rana Mahfouz. Insulinorésistance musculaire induite par les céramides : étude des mécanismes d'action et de l'implication du transporteur CERT. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066012 . tel-01172162

**HAL Id: tel-01172162**

**<https://theses.hal.science/tel-01172162>**

Submitted on 7 Jul 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (UPMC)  
ECOLE DOCTORALE PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE (ED394)

## THESE

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris VI  
Spécialité: Physiologie et Physiopathologie

# **Insulinorésistance musculaire induite par les céramides: étude des mécanismes d'action et de l'implication du transporteur CERT**

**Présentée par  
Rana MAHFOUZ**

**Directeur de thèse: Dr. Eric HAJDUCH**

Soutenue le : 06 janvier 2015

Membres du jury :

Pr. Fabrizio ANDREELLI  
Dr. Hervé GUILLOU  
Dr. Jean-François TANTI  
Dr. Corinne VIGOUROUX  
Dr. Athanassia SOTIROPOULOS

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examinatrice

## Résumé

L'obésité et le diabète de type 2 sont associés à la sédentarité et à une alimentation riche en graisses. En effet, les acides gras saturés s'accumulent dans les tissus non adipeux, comme les muscles squelettiques pour générer des lipides appelés céramides (CER). Mon projet de thèse s'est articulé en deux parties dont l'objectif est d'empêcher les CER d'agir. Nous avons montré que, selon la structure de la membrane plasmique, les CER altèrent la voie de signalisation insulinaire en ciblant la PKB, protéine clef de la voie insulinaire, *via* la voie PKC $\delta$  dans les myotubes L6 et la voie PP2A dans les myotubes C2C12. Nous avons aussi mis en évidence que les CER altèrent la sensibilité à l'insuline *via* la voie PKC $\delta$  dans les cellules musculaires humaines. Une fois les CER produits au niveau du réticulum endoplasmique (RE), ils sont transportés au Golgi par un transporteur CERT pour y être métabolisés en sphingomyéline (SM) et des études ont montré que la transformation des CER en SM pouvait être une étape cruciale pour empêcher les CER d'agir. Dans plusieurs modèles d'insulinorésistance musculaire, l'expression de CERT est diminuée et nous avons démontré l'importance du transport des céramides du RE vers le Golgi en inhibant artificiellement l'activité ou l'expression de CERT. A l'opposé, la surexpression de CERT améliore la sensibilité à l'insuline dans les cellules musculaires dans des conditions lipotoxiques. Nos résultats montrent que CERT joue un rôle crucial dans les mécanismes conduisant au développement de l'insulinorésistance musculaire puisque sa présence est essentielle pour le maintien d'un trafic normal des CER entre le RE et le golgi.

Mots clés: Insulinorésistance, cellules musculaires, palmitate, céramides, CERT, PP2A, PKC $\delta$ .

## Abstract

Obesity and type 2 diabetes are associated with a sedentary lifestyle and a diet rich in fat. Indeed, saturated fatty acids accumulate in non-adipose tissue such as skeletal muscle to generate lipids called ceramides (CER). My thesis project was divided into two parts with the objective to prevent CER to act. We have shown that, depending on the structure of the plasma membrane, CER alter the insulin signaling pathway by targeting PKB, a key insulin signalling protein, *via* a PKC $\delta$  pathway in L6 myotubes and a PP2A pathway in C2C12 myotubes. We also demonstrated that CER affect insulin sensitivity *via* the PKC $\delta$  pathway in human muscle cells. Once CER generated in the endoplasmic reticulum (ER), they are transported to the Golgi by a carrier called CERT to be metabolized into sphingomyelin (SM). Studies have shown that the transformation of CER into SM could be a crucial step to prevent CER to act. In several muscle insulin resistance models, expression of CERT is decreased and we demonstrated the importance of the transport of ceramide from the ER to the Golgi by inhibiting artificially the activity or the expression of CERT. In contrast, overexpression of CERT enhances insulin sensitivity in muscle cells in lipotoxic conditions. Our results show that CERT plays a crucial role in mechanisms leading to the development of muscle insulin resistance since its presence is essential for maintaining normal traffic of CER between the ER and the Golgi.

Key words: Insulin resistance, muscle cells, palmitate, ceramide, CERT, PP2A, PKC $\delta$ .

## Remerciements

*Je remercie sincèrement les rapporteurs Dr Jean-François TANTI et Dr Hervé GUILLOU qui ont accepté de juger ce travail, afin d'améliorer la qualité de ce mémoire. Je leur en suis reconnaissante.*

*Je remercie par ailleurs l'ensemble du jury : Dr Fabrizio ANDREELLI, Dr Corinne VIGOUROUX, Dr Athanassia SOTIROPOULOUS, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Pr Pascal FERRE pour son accueil chaleureux au sein de son unité, et pour sa présence.*

*Un grand MERCI à mon directeur de thèse Dr Eric HAJDUCH pour son encadrement scientifique. Dr Hajduch m'a supervisé tout au long de mon stage de M2 et de ma thèse. Sa patience, sa disponibilité et son optimisme légendaire m'auront permis de passer quatre années passionnantes dans son laboratoire. Grâce à ses nombreux conseils, j'ai progressé, et amélioré entre autre la qualité de mes présentations orales. Dr HAJDUCH mérite mon plus profond respect et mon passage dans son laboratoire restera gravé dans ma mémoire comme un des plus beaux moments de ma vie.*

*Je suis reconnaissante envers Dr Fabienne FOUFELLE. Ses connaissances scientifiques et ses conseils m'ont permis de mener à bien ce projet.*

*Mes remerciements également à Isabelle HAINAULT, pour son aide scientifique et pratique et sa sympathie.*

*Je souhaite remercier Cécilia PRADO, avec qui j'ai fait mes premiers pas sur la paillasse, pour ses conseils et sa disponibilité.*

*Je souhaite remercier Dr Hervé LE STUNFF et Julien VERET du laboratoire de Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine (Paris 7) pour le dosage de l'activité des caspases.*



*Je remercie également Aurore NAVIERE, Chiraz BRIK, Anaïs SZPIGEL, et Rima HAGE HASSAN. Avec elles, la thèse s'est passée tellement vite. Nous avons partagé nos bonheurs et malheurs durant ces années passées au labo. Je ne me sentais pas étrangère mais toujours entourées par leur soutien et amitié.*

*Je remercie Aurélie CARLIER pour son aide scientifique, dans les manips et dans la correction de la thèse. Je l'ai connu cette dernière année, et elle m'a impressionnée par sa gentillesse et sa bonne humeur.*

*Je remercie Moina EBOU et Ghislaine GUILLEMAIN pour leur amitié et leur sympathie.*

*Merci Kristell, André, Adrien, Pierre, Amine, Cécile, et Karima pour leur gentillesse.*

*Je remercie Anne-Françoise BATTO, pour ses conseils.*

*Je remercie l'ensemble de membres présents et passés du laboratoire, qui n'ont pas été cités, et qui ont largement contribué à me faire découvrir les joies de la recherche.*

*Évidemment, je remercie tout aussi chaleureusement les membres de ma famille au Liban, qui m'ont supporté de manière exceptionnelle. Merci infiniment à ma MERE qui avait une seule vision: me voir Docteur en Sciences!*

*Merci à ma sœur, pour son aide et sa présence au quotidien. Grâce à toi, je finirai ma thèse en toute sérénité.*

*Je ne serais jamais parvenue à cette étape majeure de mon cheminement personnel et professionnel, le dépôt de ma thèse de doctorat, sans le soutien de mon Mari Hicham. Sans toi, mes études universitaires auraient été beaucoup plus ardues !*

*Merci à mes filles Léa et Tia. Grâce à vous, j'ai eu le coup de pouce qu'il faut pour pouvoir continuer jusqu'au bout !*

*Finalement, je remercie la société : United Marble Company s.a.r.l pour le soutien financier qu'elle m'a offert tout au long de ma thèse.*

# Sommaire

Liste des abréviations .....	7
Liste des Figures.....	10
Préface.....	11
INTRODUCTION.....	13
I. Régulation de l'homéostasie glucidique .....	14
I.1 Organes contrôlant la glycémie .....	14
a) Le pancréas.....	15
b) Le foie .....	15
c) Le tissu adipeux.....	16
d) Le muscle squelettique.....	16
I.2 Système hormonal contrôlant la glycémie .....	17
a. Glucagon et Catécholamines .....	17
b. Insuline .....	17
i) Structure, biosynthèse et sécrétion .....	18
ii) Récepteur de l'insuline et voies de signalisation .....	18
II. Muscle squelettique: organe clé dans l'homéostasie glucidique.....	30
II.1 Structure du muscle squelettique .....	30
II.2 Les fonctions métaboliques des muscles squelettiques .....	32
II.2.1 Transport de glucose.....	33
i) La famille GLUT des transporteurs de glucose .....	33
ii) Transport de glucose au niveau du muscle squelettique .....	36
iii) Mécanismes de régulation du transport de glucose dans le muscle squelettique.....	38
a. Mécanismes insulino-dépendant .....	38
b. Mécanismes insulino-indépendant .....	43
II.2.2 Synthèse de glycogène.....	45
II.2.3 Synthèse protéique.....	49
II.2.4 Captage et métabolisme des acides gras .....	49
i) Structure et classification des acides gras .....	49
ii) Captage et activation des acides gras .....	51
iii) Activation des acides gras dans le cytosol .....	53
iv) Régulation de la $\beta$ -oxydation mitochondriale .....	53
v) Estérification des acides gras .....	57

vi) Synthèse des triacylglycérols.....	57
vii) Synthèse des sphingolipides.....	58
a) Voie de novo.....	60
b) Voie de recyclage.....	67
c) Voie des sphingomyélinases.....	67
III. Insulinorésistance musculaire .....	67
III.1 Importance du muscle dans l'apparition du diabète de type 2.....	67
III.2 Altération du signal insulinaire .....	68
III.3 Accumulation ectopique de lipides, cause majeure de l'insulinorésistance musculaire.....	70
III.4 Conséquences de l'accumulation ectopiques de lipides .....	71
III.4.1 Stress du réticulum endoplasmique.....	71
III.4.2 Dysfonctionnement mitochondrial et Stress oxydant.....	73
III.4.3 Inflammation .....	74
III.4.4 Production des dérivés lipidiques délétères .....	78
i) Diacylglycérols (DAG) .....	79
ii) Céramides.....	80
III.5 Importance d'autres dérivés sphingolipidiques dans la régulation de la sensibilité à l'insuline. ....	86
i) Sphingosine-1-phosphate .....	87
ii) Sphingomyéline (SM).....	88
iii) Gangliosides .....	90
iv) Céramide-1-phosphate .....	91
OBJECTIFS .....	92
RESULTATS .....	93
I. Caractérisation de l'action inhibitrice des céramides sur la signalisation insulinaire dans différents modèles musculaires: une approche mécanistique .....	94
II. Importance du transporteur des céramides CERT dans le développement de l'insulinorésistance musculaire .....	106
DISCUSSION .....	139
ANNEXES: Targeting sphingolipid metabolism in the treatment of obesity/type 2 diabetes.....	150
REFERENCES.....	172

## Liste des abréviations

ACC	: Acetyl-CoA Carboxylase
ACBP	: Acyl-CoA Binding Protein
AGPAT	: Acyl-CoA: 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase
AMPK	: Adenosine monophosphate activated protein kinase
AS160	: Protein kinase B substrate of 160KD
ATP	: Adenosine triphosphate
ATF4	: Activating Transcription Factor 4
ATF6	: Activating Transcription Factor 6
C1P	: Ceramide-1-phosphate
CAT	: Acylcarnitine translocase
Cbl	: Casitas B-lineage lymphoma
CERK	: Ceramide kinase
CerS	: Ceramide synthase
CERT	: Ceramide transporter
CLPS	: Pancreatic co-lipase
CPT1	: Carnitine palmitoyl transferase -1
CPT2	: Carnitine palmitoyl transferase -2
COX2	: Cyclo oxygenase 2
DAG	: Diacylglycerol
DGAT	: Diacylglycerol acyl transferase
FABP	: Fatty acid binding protein
FAT/CD36	: Fatty acid transporter/Cluster of differentiation 36
FATP	: Fatty acid transporter plasmatic
FoxO 1	: Forkhead box protein O 1
GAP	: Rab GTPase-activating protein domain
Gab-1	: GRB2-associated binding protein 1
GS	: Glycogen synthase
GSK3	: Glycogen synthase kinase 3
G6P	: Glucose-6-phosphate
G1P	: Glucose-1-phosphate
GLUT	: Glucose transport

GPAT	: Glycerol-3-phosphate acyl transferase
GPBDP	: Good Pasture antigen binding protein
GM3	: Monosialodihexosylganglioside
HDAC	: Histone deacetylase
IRS	: Insulin receptor binding
IRE1	: Inositol Requiring enzyme 1
IKK	: NFkB (Nuclear Factor-kB) inhibitor kinase
JNK	: C-Jun Nterminal Kinase
LCB	: Long Chain Base
LRR	: Leucin-Rich repeats
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MEF2	: Myocyte enhancer factor-2
mTORC	: Mammalian target of rapamycin complex
NO	: Nitric oxide
NOS	: Nitric oxide synthase
p70S6K	: p70 ribosomal S6 kinase
PAP	: Acid phosphatidic phosphatase
PDK1	: 3- phosphoinositide dependent protein kinase 1
PC	: Prohormone convertase
PERK	: PKR-like Endoplasmic Reticulum kinase
PEPCK	: Phosphoenol pyruvate carboxy kinase
PGC-1 $\alpha$	: Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -co-activator 1
PH	: Pleckstrin homology
PI3K	: Phosphoinositide 3, 4, 5 kinases
PKA	: Protein kinase A
PKB	: Protein kinase B
PKC	: Protein kinase C
PNLIP	: Pancreatic lipase
PP2A	: Protein phosphatase 2 A
PTB	: Phosphotyrosin binding
PTEN	: Phosphatase and Tensin homologue
RICTOR	: Rapamycin insensitive companion of mTOR
ROS	: Reactive of oxygen species
RNS	: Reactive of nitrogen species

SGLT	: Sodium/Glucose co-transporter
SH2	: Src Homology 2
Shc	: Src homology 2/ $\alpha$ collagen related
SHIP2	: SH2- containing inositol 5'-phosphatase-2
SM	: Sphingomyelin
SMS	: Sphingomyelin synthase
SMase	: Sphingomyelinase
SNARE	: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SphK	: Sphingosine kinase
SPL	: sphingolipid
SPT	: Serine palmitoyl transferase
SREBP-1c	: Sterol regulatory element binding protein-1c
START	: Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) related lipid Transfer
S1P	: Sphingosine-1-phosphate
S1PR	: Sphingosine-1-phosphate receptor
TAG	: Triacylglycerol
TLR	: Toll Like Receptor
TNF $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor $\alpha$
UPR	: Unfolded Protein Response
VAMP	: Vesicle Associated Membrane Protein
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein

## Liste des figures

**Figure 1 :** Voies de signalisation activées par l'insuline

**Figure 2 :** Structure de la fibre musculaire

**Tableau 3 :** Famille de transport facilité GLUT.

**Figure 4 :** Translocation insulino-stimulée des vésicules intracellulaires contenant GLUT4

**Figure 5 :** Régulation négative de la signalisation insulinique

**Figure 6 :** Métabolisme des acides gras dans la cellule musculaire

**Figure 7 :** Glycogénèse musculaire

**Figure 8:** Régulation de la  $\beta$  oxydation

**Figure 9 :** Voies de synthèse des céramides

**Figure 10 :** Voie de biosynthèse *de novo* des céramides

**Figure 11 :** Différents types de transport des céramides

**Figure 12 :** Isoformes du transporteur CERT

**Figure 13 :** Mécanismes induisant l'insulinorésistance dans le muscle squelettique

**Figure 14 :** Mécanismes d'inactivation de la PKB/Akt par les céramides

**Figure 15 :** Différents rôles des métabolites sphingolipidiques produits à partir des céramides

**Figure 16 :** Régulation de l'activité/expression du transporteur CERT

## Préface

En France, l'incidence du diabète a presque doublé entre 2000 et 2008 et atteint près de 1,8 millions de personnes. Le coût annuel consacré au traitement du diabète et de ses complications en France, est de 1 milliard d'euros. On distingue principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 (DT1) qui touche 10% des diabétiques, le diabète de type 2 (DT2) qui en touche 85% à 90%.

Le DT1, anciennement appelé diabète insulino-dépendant est principalement décelé chez des sujets jeunes. Ce diabète, qui est une maladie auto-immune, résulte de la disparition des cellules  $\beta$  du pancréas. Les causes de cette maladie s'expliquent en partie par une prédisposition génétique (familiale) mais aussi par des conditions environnementales.

Le DT2 touche 3 millions de personnes en France, soit environ 4% de la population. Véritable épidémie planétaire, ce type de diabète est fortement lié à un mode de vie sédentaire et à une alimentation trop riche. Le DT2 apparaît généralement chez le sujet de plus de 40 ans et le surpoids, l'obésité et le manque d'activité physique sont les causes révélatrices du DT2 chez des sujets génétiquement prédisposés. Le DT2 est caractérisé à la fois par une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline et par un défaut d'insulino-sécrétion.

L'insuline, sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas en réponse à des niveaux croissants de glucose et d'acides aminés circulants après un repas, régule l'homéostasie glucidique en réduisant d'une part la production hépatique de glucose et en augmentant d'autre part le captage du glucose principalement dans le muscle squelettique et le tissu adipeux. L'insuline joue aussi un rôle important dans le métabolisme lipidique en augmentant la synthèse lipidique dans le foie et les adipocytes, tout en réduisant la libération des acides gras du tissu adipeux. En situation de résistance à l'insuline, la cascade de signalisation insulinique est altérée et l'action de l'insuline inhibée. Cela entraîne, entre autre, une augmentation massive de la lipolyse du tissu adipeux et de la production hépatique de glucose, conduisant à l'apparition d'une hyperglycémie et d'une hyperlipidémie, conduisant à un phénomène de gluco-lipotoxicité, et finalement à l'apparition d'un diabète lorsque la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  ne peut plus compenser l'insulino-résistance des tissus périphériques.

Il est maintenant accepté que l'accumulation ectopique de lipides dans les organes insulino-sensibles est un facteur important dans l'étiologie de la résistance à l'insuline et du DT2 (Hage Hassan et al., 2014; Shulman, 2000). Plus précisément, de plus en plus d'évidences vont dans le sens qu'une augmentation de la synthèse de dérivés lipidiques particuliers à partir des



acides gras saturés soit un facteur majeur dans le développement de la résistance à l'insuline induite par une surabondance lipidique.

Le muscle est un organe important à prendre en compte pour l'étude de l'insulino-résistance. En effet, à l'état basal, la contribution du muscle squelettique sur le captage total du glucose est d'environ 30%, et de plus de 80% après un repas. Ce tissu est très important pour limiter l'ampleur et la durée des hyperglycémies postprandiales. Un défaut d'action métabolique de l'insuline au niveau musculaire est donc particulièrement délétère pour l'homéostasie glucidique de l'organisme et peut favoriser rapidement l'apparition d'un diabète en cas de dysfonction beta cellulaire associée. Il est par conséquent important de comprendre les mécanismes favorisant l'insulino-résistance au niveau musculaire. Dans les muscles squelettiques, ce sont des dérivés sphingolipidiques appelés céramides qui ont été décrits comme les principaux intermédiaires lipidiques impliqués dans la perte d'action de l'insuline (Dobbins et al., 2002; Turban and Hajduch, 2011).

Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse à l'étude des mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline au niveau musculaire. Le but de ma thèse a été d'essayer d'aller plus loin dans la compréhension de la régulation des mécanismes d'action des céramides au niveau musculaire dans le but ultime de mettre en place des stratégies de prévention, mais également pour essayer de mettre évidence de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre le DT2.

# INTRODUCTION

## ***I. Régulation de l'homéostasie glucidique***

Tout organisme requiert en permanence de l'énergie pour maintenir ses fonctions vitales. Face à cette nécessité et pour pallier l'apport discontinu en substrats énergétiques, de nombreux mécanismes de régulation sont mis en jeu pour assurer, soit la métabolisation immédiate des substrats, soit leur stockage en vue d'une utilisation future. L'ensemble de ces mécanismes de gestion des substrats est regroupé sous le terme d'homéostasie énergétique. Parmi les principales sources d'énergie de l'organisme (glucides, lipides et protéines), le glucose est la molécule énergétique la plus utilisée dans des conditions physiologiques, du fait de sa disponibilité immédiate et qu'il soit le seul substrat énergétique du cerveau. Toutefois, les concentrations circulantes du glucose (glycémie) doivent être maintenues dans des limites strictes afin de ne pas mettre l'intégrité de l'organisme en péril. En effet, une hypoglycémie sévère peut conduire à des malaises ou des pertes de conscience, et une hyperglycémie peut être à l'origine de symptômes mineurs comme de la fatigue, un besoin fréquent d'uriner et une perte de poids, mais peut aussi être associée à des complications plus graves associées au diabète (rétinopathie, néphropathie, neuropathie, maladies cardiovasculaires...). Pour cela, il existe tout un ensemble de mécanismes capables de contribuer à cet équilibre. Cet ensemble porte le nom d'homéostasie glucidique. Ainsi, il existe des mécanismes permettant d'oxyder le glucose afin de produire de l'adénosine triphosphate (ATP), molécule fournissant l'énergie nécessaire aux réactions métaboliques. Dans les périodes postprandiales, c'est-à-dire au cours de l'élévation de la glycémie suivant une prise alimentaire, d'autres processus biochimiques permettent le stockage du glucose sous diverses formes en vue de son utilisation ultérieure. Enfin, dans le cas d'un jeûne, lorsque la glycémie tend à diminuer, l'ensemble des stocks accumulés auparavant va être mobilisé et utilisé. Si ce jeûne se poursuit, l'organisme est alors capable de mettre en jeu des mécanismes complémentaires permettant d'utiliser d'autres substrats afin de produire *de novo* du glucose (néoglucogenèse), et ainsi palier aux carences du moment.

### ***I.1 Organes contrôlant la glycémie***

Le maintien de l'homéostasie glucidique est rendu possible par de nombreux systèmes de communication établis le système nerveux central, le système parasympathique et les organes insulino-sensibles impliqués (foie, tissu adipeux, pancréas et muscle squelettique). Dans la

suite de mon introduction the thèse, je vais principalement concentrer mon message sur le tissu dont j'ai étudié la régulation glucido-lipidique (muscle squelettique) après toutefois avoir rapidement introduit l'importante implication des autres tissus.

#### ***a) Le pancréas***

L'arrivée de glucose dans la circulation sanguine va notamment être détectée par le pancréas. Son rôle dans la régulation de l'homéostasie glucidique est important du fait de la sécrétion d'hormones telles que l'insuline ou le glucagon par les îlots de Langerhans. Ces derniers comprennent 4 types cellulaires, plus ou moins nombreux. Ainsi, chez l'homme (Brissova et al., 2005; Brissova et al., 2002), les cellules les plus représentées (65 à 80%) sont les cellules  $\beta$ , responsables de la production de l'insuline. Viennent ensuite les cellules  $\alpha$  (15 à 20%), qui produisent le glucagon. Enfin, en forte minorité les cellules delta produisent aussi la somatostatine (3 à 5%) qui inhibe la sécrétion d'insuline et de glucagon, mais aussi la sécrétion de l'hormone de croissance GH (Strowski and Blake, 2008; Stengel et al., 2010). Et les cellules F sécrètent le peptide pancréatique (moins de 1%) qui inhibe la sécrétion exocrine du pancréas comme l'amylase et la lipase pancréatique (Kojima et al., 2007). La production de ces hormones va permettre aux organes périphériques de stocker le glucose ou inversement, d'utiliser les stocks glucidiques existants en fonction de l'état métabolique de l'organisme.

#### ***b) Le foie***

Le foie est le premier organe à rencontrer le glucose absorbé par l'intestin *via* la veine porte hépatique après digestion alimentaire. En effet, le foie est un véritable chef d'orchestre de la régulation de la glycémie: il est capable, en périodes post-prandiales, de stocker le glucose en synthétisant un polymère de réserve, le glycogène (glycogénogenèse) si la glycémie est élevée ou stable. Quand les stocks de glycogène sont saturés au niveau du foie, ce dernier utilise le glucose pour produire des triacylglycérols sécrétés dans la circulation sanguine (lipogenèse). En revanche, le foie produit du glucose ( $\approx 80\%$  de la production endogène de glucose, PEG) à partir de l'hydrolyse du glycogène (glycogénolyse) à l'état post-absorptif (12h chez l'homme et 6h chez le rat ou la souris après un repas). Si le jeûne se prolonge, la production de glucose s'effectue via une synthèse *de novo* (néoglucogenèse) à partir de différents substrats comme les acides aminés, le lactate, et le glycérol (Girard et al., 1997). Enfin, si le jeûne perdure, le foie diminue sa production glucidique et est relayé par les reins ( $\approx 45\%$  de la PEG) et

l'intestin grêle ( $\approx 35\%$  de la PEG) à partir du glutamine (Mithieux et al., 2009; Mithieux et al., 2006; Mithieux et al., 2004).

### *c) Le tissu adipeux*

Outre le foie, le tissu adipeux est également capable de d'accumuler des réserves énergétiques, en partie par l'utilisation du glucose. On distingue 2 types de tissus adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux brun a pour principal rôle de participer à la régulation de la température corporelle par un phénomène de thermogenèse (Ouellet et al., 2012; Orava et al., 2011). Le tissu adipeux blanc est, quant à lui, le plus abondant et constitue l'organe primaire de stockage des lipides en période post-prandiale (lipogenèse) (Aarsland et al., 1997). En revanche, le tissu adipeux blanc libère les acides gras (lipolyse) dans des conditions de jeûne. Il est également considéré comme un organe endocrine à part entière, du fait de son importante activité sécrétoire (Ailhaud, 2000). Ces protéines sécrétées, portant le nom d'adipokines (leptine, adiponectine, et cytokines), sont capables d'agir par voie endocrine pour réguler la prise alimentaire et la sécrétion d'insuline et la sensibilité à l'insuline, paramètres essentiels dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Guerre-Millo, 2004).

### *d) Le muscle squelettique*

Le muscle squelettique participe également à la régulation de l'homéostasie glucidique du fait qu'il est responsable de 85% de l'absorption de glucose postprandial et qu'il représente 40 à 60% de la masse totale du corps humain. Cet organe, peut directement utiliser le glucose capté pour produire de l'énergie, mais également générer des réserves énergétiques sous forme de glycogène (glycogenèse) (bien que la capacité de stockage par cellule du muscle soit largement inférieure à celle de l'hépatocyte).

Les mécanismes de régulation de la glycémie par le muscle seront précisément discutés dans la section II.

## *1.2 Système hormonal contrôlant la glycémie*

### *a) Glucagon et catécholamines*

**Le glucagon** (polypeptide de 29 acides aminés) est une hormone hyperglycémiante, sécrétée par les cellules  $\alpha$  pancréatiques. Le glucagon se fixe sur les récepteurs membranaires spécifiques de ses cellules cibles (essentiellement les cellules hépatiques, mais aussi les

cellules adipeuses) et agit en stimulant la glycogénolyse (voir chapitre synthèse de glycogène), la lipolyse et la néoglucogenèse. Dans des conditions de stress, de jeûne ou d'exercice physique, en réponse à des signaux nerveux tels que le système nerveux sympathique (Marliss et al., 1973), à des signaux hormonaux (ghréline, et adrénaline) (Gromada et al., 2007; Quesada et al., 2008) et à des signaux métaboliques de faibles concentrations en glucose, acides aminés (Gromada et al., 2007; Quesada et al., 2008) ainsi qu'une courte exposition aux acides gras (Bollheimer et al., 2004; Hong et al., 2007; Olofsson et al., 2004), le glucagon est sécrété. A l'inverse, dans le contexte d'une prise alimentaire, lorsque la glycémie augmente, la sécrétion de glucagon est inhibée (Gromada et al., 2007; Quesada et al., 2008; Burcelin et al., 2008). Ainsi, le glucagon inhibe l'utilisation et le stockage du glucose en inhibant respectivement la pyruvate kinase (enzyme de la glycolyse) et la glycogène synthase (Andersen et al., 1999; Haynes, Jr. and Picking, 1990).

**Les catécholamines** sont des composés organiques synthétisés à partir de la tyrosine qui jouent le rôle d'hormone ou de neurotransmetteur. Les catécholamines les plus courantes sont l'adrénaline (épinéphrine), la noradrénaline (norépinéphrine) et la dopamine (Carlsson and Hillarp, 1958).

Tout traumatisme physique ou émotionnel (douleur, épuisement, anxiété, choc...etc.) déclenche dans la médullosurrénale une sécrétion d'adrénaline élevant la glycémie pour procurer à l'organisme le supplément d'énergie exigé par la situation, en agissant essentiellement sur la glycogénolyse hépatique et la lipolyse au niveau des adipocytes blancs (Tobin et al., 2012; Dufour et al., 2009).

## ***b) Insuline***

Après un repas, les concentrations de glucose circulant sont élevées et l'insuline est la seule hormone capable de diminuer la glycémie. Au niveau hépatique, elle diminue la néoglucogenèse, augmente la glycogénèse et la lipogénèse. Au niveau musculaire et adipocytaire, elle facilite le captage de glucose et des acides aminés, augmente l'anabolisme protéique et diminue la lipolyse dans le tissu adipeux.

### ***i) Structure, biosynthèse et sécrétion***

L'insuline est un peptide de 6 kDa sécrété par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas suite à une augmentation de la glycémie. L'insuline mature est synthétisée à partir d'une molécule précurseur, la proinsuline, suite à l'action des enzymes protéolytiques,

prohormone-convertases 1 et 2 (PC1 et PC2) puis de la carboxypeptidase exoprotease E dans les cellules  $\beta$  du pancréas. C'est une hormone constituée de deux chaînes polypeptidiques de 21 et 30 acides aminés reliées par des ponts disulfure. L'insuline est stockée dans des granules de sécrétion qui s'accumulent à l'état basal au niveau de l'appareil de Golgi. Lors d'une stimulation de la cellule  $\beta$  par des concentrations accrues de glucose, l'insuline est libérée dans la circulation par exocytose des vésicules sécrétoires.

## *ii) Récepteur de l'insuline et voies de signalisation*

### *• Récepteur de l'insuline*

L'insuline agit sur ses cellules cibles en se fixant à son récepteur membranaire. Le récepteur de l'insuline est exprimé sur la plupart des cellules, mais il est présent en plus grande quantité dans les tissus cibles des effets métaboliques de l'hormone qui sont le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Ce récepteur transmembranaire est un hétérodimère  $\alpha$ - $\beta$  appartenant à la famille des récepteurs tyrosines-kinases (Tatnell et al., 1983; Whittaker et al., 2008). La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation de la sous-unité  $\beta$  du récepteur sur de nombreux résidus tyrosines. Cette autophosphorylation du récepteur stimule son activité tyrosine kinase envers des substrats cellulaires comme les protéines IRS (insulin receptor substrate), Gab-1 (GRB2-associated-binding protein 1) et Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma) dont vont dépendre les effets métaboliques, mais aussi les protéines Shc (Src homology 2/ $\alpha$  collagen-related) relayant les effets mitogéniques de l'insuline (Saltiel and Kahn, 2001) (figure 1).

### Cavéoles membranaires: structures nécessaires pour une bonne transmission du signal insulinique ?

Il a été montré que la composition/structure de la membrane plasmique joue un rôle essentiel dans la distribution et la stabilisation du récepteur insulinique et dans la transmission du signal insulinique. En effet, la composition lipidique de la membrane plasmique n'est pas uniforme et certains lipides comme les sphingolipides et le cholestérol peuvent se retrouver concentrer dans des microdomaines membranaires appelés cavéoles. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique abondantes dans certains types cellulaires comme les cellules endothéliales, les pneumocytes, les cellules musculaires et les adipocytes, dans lesquelles elles peuvent couvrir jusqu'à 30% de la surface plasmique (Razani et al., 2002). Les cavéoles sont caractérisées par la présence d'une protéine structurale importante, la cavéoline. Trois membres constituent la famille des cavéolines. Chez les mammifères, la

cavéoline-1 et la cavéoline-2, possédant chacune deux isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), sont présents dans tous les types cellulaires et particulièrement exprimées dans les adipocytes et les cellules endothéliales (Rothberg et al., 1992). La cavéoline-3, quant à elle, n'est pas retrouvée que dans les cellules musculaires (Tang et al., 1996).

La composition lipidique des membranes au niveau des cavéoles est enrichie en sphingolipides et en cholestérol. Ces lipides confèrent à ces structures la propriété de résister à l'action solubilisante des détergents non ioniques (Simons and Toomre, 2000). L'utilisation de cette propriété pour isoler les radeaux lipidiques contenant les cavéoles est la seule actuellement disponible en l'absence de technique d'imagerie permettant d'observer ces structures dans les cellules vivantes. Ces structures invaginées concentrent et organisent sous le contrôle du domaine de liaison (« scaffolding ») de la cavéoline de nombreuses molécules de signalisation (récepteurs tyrosine kinase, récepteurs couplés aux protéines G etc...) (Razani et al., 2002).

Les cavéolines ont, entre autres, la capacité de lier *in vitro* et *in vivo*, le cholestérol et les sphingolipides, les deux constituants lipidiques principaux des cavéoles (Thiele et al., 2000). La déplétion en cholestérol des cellules par des agents comme la nystatine, la filipine ou la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, provoque également la disparition de cavéoles morphologiquement identifiables (Rothberg et al., 1992).

De nombreux arguments en faveur de la localisation du récepteur de l'insuline dans les cavéoles ont été avancés. Ces études s'appuient notamment sur des techniques d'imagerie en microscopie électronique, d'isolement biochimique des cavéoles et d'immunoprécipitation de la cavéoline-1 avec le récepteur de l'insuline (Yamamoto et al., 1998; Gustavsson et al., 1999; Nystrom et al., 1999; Kimura et al., 2002). D'autres acteurs de la voie semblent être également présents au sein des cavéoles. On peut citer par exemple IRS-1, la PI3K et PDK1 (Chun et al., 2005; Gustavsson et al., 1999; Smith et al., 1998).

Certaines études sur des cellules en culture ont établi que les cavéolines étaient des régulateurs positifs de la réponse à l'insuline. Ainsi, la destruction des caveolae réalisée par le traitement des adipocytes avec des agents séquestrant le cholestérol membranaire (méthyl- $\beta$ -cyclodextrines), ou qui l'oxyde (cholestérol oxydase), diminuent la réponse à l'insuline des adipocytes *in vitro* (Gustavsson et al., 1999; Parpal et al., 2001; Furuchi and Anderson, 1998). Ces observations ont été confortées *in vivo* par la présence d'une résistance à l'insuline du tissu adipeux des souris dont le gène de la cavéoline-1 a été invalidé. De plus, la surexpression de cavéolines (1 et 3) et du récepteur à l'insuline dans des cellules qui en sont



initialement dépourvues permet l'augmentation de l'activité kinase de ce récepteur (Yamamoto et al., 1998; Nystrom et al., 1999).

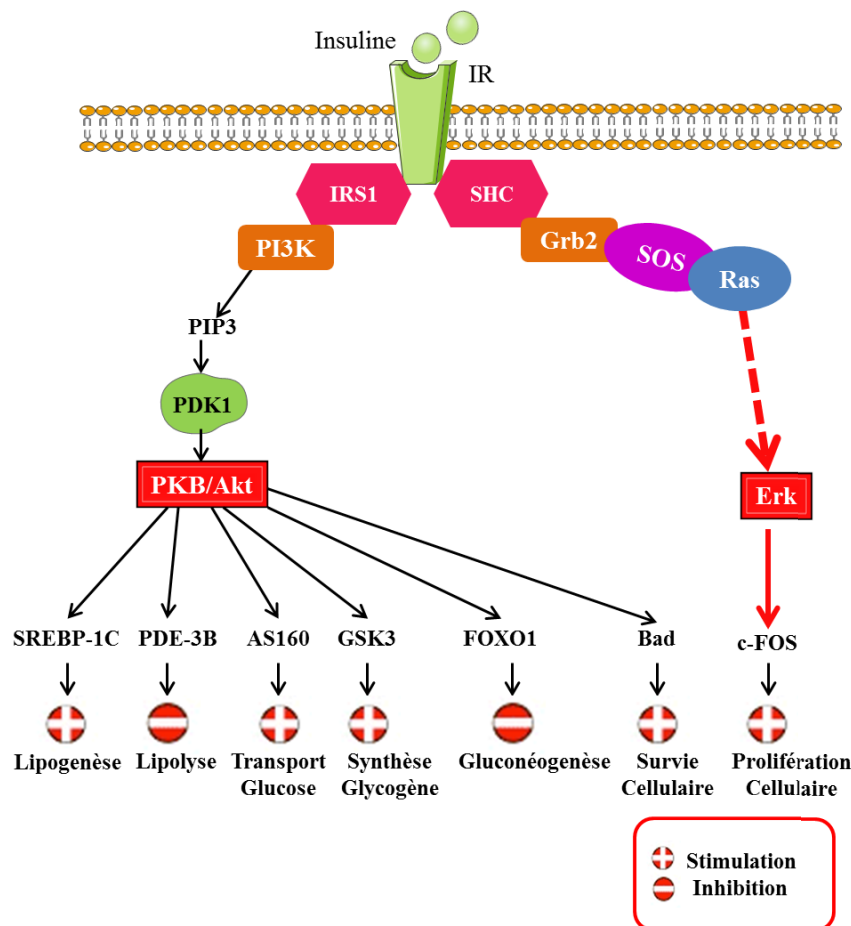
D'autre part, il s'avère que chez les souris déficientes en cavéoline-1, la stabilité du récepteur de l'insuline est diminuée, conduisant à sa dégradation par le protéasome (Cohen et al., 2003). Ces animaux montrent un état d'insulino-résistance qui peut être expliqué par la diminution importante de la quantité de récepteur de l'insuline disponible à la membrane plasmique. Au sein des cavéoles, la cavéoline semble avoir deux actions distinctes. D'une part, elle stabilise le récepteur de l'insuline et en accroît l'activité (en présence d'un stimulus) ce qui correspond à une influence positive sur la cascade dont ce récepteur constitue la première étape. Parallèlement à cela, la cavéoline interagit avec d'autres acteurs (IRS-1, PI3K, PDK1) en exerçant sur eux une inhibition. On peut imaginer qu'elle a pour but de maintenir ces protéines à proximité du récepteur de l'insuline dans un état inactif que pourra lever l'activation de ce récepteur par l'insuline.

Néanmoins, deux groupes considèrent que le récepteur de l'insuline n'est pas localisé dans les cavéoles en utilisant des outils similaires mais avec des protocoles différents (Souto et al., 2003; Mastick et al., 1995).

Une étude pourrait permettre de concilier ces résultats divergents. En effet, en 2007, il a été montré que le récepteur de l'insuline se situerait en fait au niveau du « cou/collerette » des cavéoles et pas dans sa partie « bulbeuse » (Foti et al., 2007).

Les différences dans les protocoles utilisés, dans les études précédentes, lors de la fixation des échantillons et de l'isolement des cavéoles pourraient permettre d'expliquer les données contradictoires de la littérature.

De manière intéressante, dans des conditions physiopathologiques, la signalisation insulinique, *via* l'action de dérivés sphingolipidiques comme les céramides, est altérée au niveau de ces domaines (discuté plus bas, chapitre « céramide et insulino-résistance »).



**Figure 3: Voies de signalisation activées par l'insuline**

Une fois l'insuline liée à son récepteur, deux voies de signalisation sont activées en parallèle:

- La voie « PI3K » qui, grâce à de nombreux effecteurs, induit:
  - 1) L'activation de la lipogenèse, le transport de glucose et la synthèse du glycogène;
  - 2) L'inhibition de la lipolyse et de la gluconéogenèse;
  - 3) La stimulation de la survie cellulaire ;
- La voie ERK qui stimule la prolifération cellulaire.

- ***Insulin receptor substrates (IRSs)***

Les IRSs sont des cibles physiologiques importantes activées par le récepteur de l'insuline. Six isoformes d'IRS sont identifiés mais seulement (IRS1, IRS2, IRS3 et IRS4) ont été montrés comme impliqués dans la signalisation insulinaire (Withers et al., 1998; Tamemoto et al., 1994).

IRS1 et IRS2 ont une distribution tissulaire similaire. Dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux, IRS1 est l'isoforme impliqué dans la signalisation insulinaire, alors que dans le foie, IRS2 est celui qui conduit principalement les effets métaboliques de l'insuline. Dans le pancréas, IRS2 joue un rôle important dans la régénération cellulaire (Kubota et al., 2000).

Des études *in vivo* ont révélé la fonction des deux isoformes IRS1 et 2 dans les tissus insulinosensibles (Lin et al., 2004; Huang et al., 2005; Cantley et al., 2009; Norquay et al., 2009). Les souris dépourvues d'IRS1 développent un retard de croissance, une résistance modérée à l'insuline (principalement au niveau musculaire, rien au niveau hépatique), une hyperinsulinémie et des ilots hyperplasiques, mais sans développer de diabète car une augmentation d'expression d'IRS2 dans les cellules  $\beta$ , compensant l'absence d'IRS1 a été observée (Araki et al., 1994). Les souris dépourvues d'IRS2 développent une insulino-résistance et une hypoplasie des ilots pancréatiques, causant ainsi un diabète (Kubota et al., 2000 ; Withers et al., 1998). Ces observations suggèrent qu'IRS1 et IRS2 n'ont pas une redondance fonctionnelle absolue, le premier étant plus responsable de l'action de l'insuline sur le métabolisme glucidique dans les cellules insulino-sensibles, et le second jouant un rôle plus important dans la coordination du mécanisme compensateur des cellules  $\beta$  en présence d'une insulino-résistance.

La principale fonction des IRSs est de relayer le signal insulinique entre le récepteur de l'insuline et les protéines de signalisation en aval de ce dernier. Pour accomplir cette tâche, tous les IRSs possèdent dans leur région N-terminale un domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH) qui leur permettent de se positionner au niveau de la face cytosolique de la membrane plasmique grâce à leur reconnaissance préalable des phospholipides membranaires. L'IRSs positionne ainsi son domaine phosphotyrosine binding (domaine PTB), adjacent au domaine PH, en face de la tyrosine 960 du domaine juxtamembranaire du récepteur de l'insuline et se fixe sur la tyrosine 960 phosphorylée par l'intermédiaire de ce domaine PTB (Paz et al., 1996).

La région C-terminale des IRSs se trouve alors à proximité du domaine tyrosine kinase du récepteur, qui phosphoryle des résidus tyrosines spécifiques sur les IRS (White, 2002). Les protéines IRS ainsi phosphorylées sont à leur tour reconnues par les domaines SH2 (src homology 2) de protéines relais, les principales étant la sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), les protéines adaptatrices growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) et CrkII, la tyrosine-kinase Fyn et la phosphotyrosine phosphatase SHP2 (SH2 domain protein tyrosine phosphatase-2) (Whitehead et al., 2000).

Par contre, l'implication des isoformes IRS3 et IRS4 dans le signal insulinique semble moins évidente (Liu et al., 1999b; Fantin et al., 2000). Chez les rongeurs, IRS3 est principalement exprimé dans les adipocytes, et n'est probablement pas exprimé chez l'homme (Sciacchitano and Taylor, 1997). IRS4, quant à lui, est exprimé chez l'homme, mais n'est probablement pas

très impliqué dans la signalisation de l'insuline puisque son invalidation chez la souris n'affecte pas de façon marquée l'homéostasie glucidique (Fantin et al., 2000).

### Régulation négative des IRSs

Au niveau moléculaire, la phosphorylation de résidus sérines d'IRS1 est responsable de l'altération du signal insulinaire. Cette altération peut être la conséquence d'une inhibition de l'interaction IRS/récepteur insulinaire, ou d'une inhibition de l'interaction IRS/PI3K, ou d'une induction de la dégradation de la protéine IRS1 (Copps and White, 2012).

La stimulation prolongée de l'insuline exerce aussi un rétrocontrôle négatif sur IRS1 par l'intermédiaire d'un groupe de kinases insulino-stimulées, comme celles composant la voie mTORC1/S6K1 (Um et al., 2004). mTOR (mammalian target of rapamycin) existe en deux complexes distincts, le complexe 1 (mTORC1) et le complexe 2 (mTORC2). mTORC1 est composé de mTOR (sous-unité catalytique du complexe), raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (aussi connu sous le nom de GpL [mammalian lethal with Sec13 protein 8]), PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa) et Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) (Zarogoulidis et al., 2014). La S6K1 est phosphorylé et activé par mTORC1. Les protéines S6K sont des Ser/Thr kinases de la superfamille de AGC kinase (Um et al., 2006), et l'hyperactivation de S6K1 en présence d'excès de nutriments, d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie cause une résistance à l'insuline de par la création d'une boucle de rétrocontrôle négative sur la signalisation de l'insuline. Ainsi, le complexe mTORC1/S6K1 phosphoryle IRS1 sur le résidu Sérine 302 (Sérine 307 chez l'humain), inhibant ainsi la fonction du domaine PTB d'IRS1 (She et al., 2009), et conduisant à sa dégradation (Harrington et al., 2004). De plus, dans des conditions d'insulinorésistance, certaines kinases activées comme la S6K1, certaines protéines kinases C (PKCs), la JNK (c-jun N-terminal kinases), et ERK, peuvent phosphoryler des résidus sérine d'IRS1, altérant ainsi la signalisation insulinaire (Gual et al., 2005; Tanti and Jager, 2009; Boura-Halfon and Zick, 2009). IRS1 est aussi inhibé par les protéines SOCS1 et les SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 1 et 3), protéines stimulées par les cytokines (Yoshimura et al., 1995). Les SOCS1 et les SOCS3 se lient aux résidus tyrosine d'IRS1 et induisent ainsi sa dégradation par le protéasome (Rui et al., 2002). Le chapitre III.2 détaille plus les défauts d'activation des IRSs dans des conditions physiopathologiques.

- **Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)**

Il existe trois grandes classes de PI3K (I-III) divisées selon leur préférence pour des substrats lipidiques et leur activation. La PI3K de classe I génère principalement du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI-3,4,5-P<sub>3</sub>) à partir du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI-4,5-P<sub>2</sub>) en phosphorylant le noyau inositol en position 3 des lipides phosphoinositides présents dans la membrane plasmique des cellules. La PI3K de classe II génère du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI-3-P) à partir du PI et du phosphatidylinositol-3,4-biphosphate (PI-3,4-P<sub>2</sub>) à partir de PIP *in vitro* (et possiblement du PI-3,4,5-P<sub>3</sub> à partir de PI-4,5-P<sub>2</sub> *in vivo*). Finalement, la PI3K de classe III génère essentiellement du PI-3-P à partir de PI (Katso et al., 2001). La PI3K de classe IA relaie le signal insulinaire car étant le seul isoforme capable d'être activé après liaison avec les IRSs.

La PI3K est formée d'une sous-unité régulatrice p85 qui se lie à l'IRS et d'une sous-unité catalytique p110. Cinq isoformes de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K sont codées par 3 gènes différents : le gène *Pik3r1* (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$  et p50 $\alpha$ ), le gène *Pik3r2* (p85 $\beta$ ), et le gène *Pik3r3* (p55 $\gamma$ ) (Vanhaesebroeck et al., 1997; Fruman, 2010; Taniguchi et al., 2006; McCurdy and Klemm, 2013). Ces isoformes contrôlent non seulement la localisation subcellulaire de l'enzyme mais aussi sa stabilité et l'activation des sous-unités catalytiques p110 *via* des domaines d'interactions de la P85 nommés SH2, ayant une affinité pour les résidus tyrosines phosphorylés (Yu et al., 1998). Les isoformes régulatrices p85 possèdent tous les domaines Src homology 2 : N-terminal SH2 et C-terminal SH2, séparés par un iSH2 (intervening coiled-coiled domain), ce dernier, relayant la liaison avec les sous-unités catalytiques p110 (Fruman et al., 1996; Inukai et al., 1996).

Trois gènes distincts codent pour les trois isoformes p110 de la PI3K de classe IA : p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\delta$ . Ils possèdent tous un domaine de liaison à la sous-unité p85 et un domaine catalytique. Les sous-unités p110 ne semblent pas avoir de spécificité de liaison avec les différentes sous-unités régulatrices, laissant donc place à la formation d'une multitude d'hétérodimères différents.

La sous-unité régulatrice p85 agit comme un adaptateur et se lie à l'entité catalytique p110 avec l'un de ses domaines SH2 pour finalement l'accrocher à la membrane. L'interaction de la sous-unité régulatrice p85 avec la sous-unité catalytique p110 se trouve ainsi stabilisée et permet de maintenir inhibée l'activité catalytique de p110 dans des conditions basales. En réponse à l'insuline, les domaines SH2 de la sous-unité p85 interagissent avec des séquences spécifiques contenant une tyrosine phosphorylable de type (YXXM) portée par les protéines IRS, induisant ainsi l'activation de la sous-unité catalytique.

Suite à l'activation de la PI3K de classe IA par l'insuline, du PIP<sub>3</sub> est généré à partir du PIP<sub>2</sub>. Ce dernier se lie ensuite à des protéines possédant un domaine d'homologie à la Plekstrine (domaine PH) comme la PKB/Akt et la 3-phosphoinositide-dependent protein Kinase 1 (PDK1) (Virkamaki et al., 1999). La liaison de ces deux kinases avec du PIP<sub>3</sub> induit leur accrochage à la membrane plasmique, permettant ainsi l'activation de la PKB/Akt (voir plus bas).

L'activité de la PI3K peut être indirectement inhibée par la déphosphorylation des PIP<sub>3</sub> générés par l'enzyme. Deux phosphatases sont impliquées dans ce mécanisme : la phospholipide phosphatase and tensin homolog (PTEN) et la SH2-containing inositol 5'-phosphatase-2 (SHIP2). Le détail de leurs mécanismes d'action est décrit dans le chapitre « Régulation du signal insulinique *via* des phosphatases lipidiques ».

- **Protéine kinase B/Akt**

La PKB/Akt est une protéine sérine/thréonine kinase dont la famille compte trois membres : PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2 et PKB $\gamma$ /Akt3. La PKB  $\alpha$ /Akt1 est exprimée de façon ubiquitaire, la PKB  $\beta$ /Akt2 est présente majoritairement dans les tissus insulino-sensibles (foie, tissu adipeux et les muscles) et la PKB $\gamma$ /Akt3 est prédominante dans le cerveau (Yang et al., 2004).

La PKB  $\beta$ /Akt2 est l'isoforme impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique puisque les souris déficientes en PKB  $\beta$  sont intolérantes au glucose et insulino-résistantes. Ces souris présentent un captage glucidique altéré au niveau des tissus périphériques et une production hépatique de glucose élevée, ainsi qu'une augmentation de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques (Cho et al., 2001; Easton et al., 2005; Lu et al., 2012; Treins et al., 2012).

Par contre, l'ablation totale des deux autres isoformes  $\alpha$  et  $\gamma$  n'affecte significativement pas le métabolisme de glucose (Cho et al., 2001; Easton et al., 2005).

Il a été montré que la PKB $\alpha$ /Akt1 est impliqué dans la survie cellulaire en inhibant l'apoptose (Hajdich et al., 1998; Cho et al., 2001; Bernal-Mizrachi et al., 2001; Tuttle et al., 2001; Shioi et al., 2002). Cet isoforme peut aussi induire la synthèse protéique, ce qui en fait un élément clef dans les phénomènes cellulaires conduisant à l'hypertrophie des muscles squelettiques et la croissance des tissus en général (Hajdich et al., 1998; Cho et al., 2001; Bernal-Mizrachi et al., 2001; Tuttle et al., 2001; Shioi et al., 2002).

La PKB $\gamma$ /Akt3 joue un rôle important dans le développement post-natal du cerveau chez les mammifères (Easton et al., 2005; Tschopp et al., 2005; Dummler and Hemmings, 2007).

Si les trois isoformes ont un rôle différent dans l'organisme, elles sont néanmoins activées similairement en réponse à l'insuline. En situation basale, la PKB/Akt est localisée principalement dans le cytosol et elle est rapidement mobilisée vers la membrane plasmique en réponse à une stimulation insulinique (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). Ainsi, ce processus requiert l'activation de la PI3-kinase et la production de PIP<sub>3</sub> nécessaires pour le recrutement de la PKB/Akt vers la membrane plasmique *via* son domaine PH. Cette interaction entre le domaine PH et les lipides membranaires permet ainsi un changement de conformation de la PKB/Akt, démasquant ainsi le site Thr308, contenu dans la boucle d'activation du domaine kinase et le rendant disponible pour être phosphorylée par la PDK-1 (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). Afin d'être pleinement active, la PKB/Akt requiert également la phosphorylation d'un autre résidu (Ser473) situé dans l'extrémité régulatrice C-terminale (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000; Osaki et al., 2004; Alessi et al., 1996) par le complexe TORC2 (formé de mTOR (mammalian target of rapamycin) et RICTOR (rapamycin insensitive companion of mTOR) (Hresko and Mueckler, 2005).

Le domaine catalytique sérine/thréonine kinase occupe la partie centrale de la PKB/Akt. C'est l'homologie de ce dernier avec celui de la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) qui a valu à cette protéine le nom de PKB. Finalement, un domaine de régulation de l'activité kinase est situé en son extrémité C-terminale.

La PKB/Akt ainsi activée quittera la membrane cellulaire pour rejoindre ses différents substrats comme AS160 impliqué dans le transport de glucose, GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) impliquée dans la synthèse de glycogène, SREBP-1C (Sterol regulatory element binding protein-1c) impliqué dans la lipogenèse.

### Voies métaboliques régulées par la PKB/Akt

La PKB/Akt relaie l'action de l'insuline dans la régulation du métabolisme des trois grandes familles de nutriments (glucides, lipides et protides), essentiellement au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle.

➤ *Captage du glucose* (dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et le cœur). Environ 30% du glucose absorbé en post prandial est capté par le foie. Le glucose qui échappe au foie est ensuite capté par les tissus périphériques (muscle squelettique et tissu adipeux). L'insuline favorise ce captage en augmentant les quantités de transporteurs de glucose à la surface des

cellules. Brièvement, lorsque la PKB/Akt est activée en réponse à l'insuline, elle phosphoryle et inactive la protéine AS160 qui maintient les vésicules de transport de glucose GLUT4 dans le cytoplasme. Une fois l'AS160 inhibée, les vésicules contenant les transporteurs sont relarguées vers la membrane plasmique, induisant ainsi une augmentation de l'entrée du glucose dans la cellule (plus de détails dans le chapitre II.2.1 « Transport du glucose »).

➤ *Glycogénèse* (dans le foie et le muscle squelettique). La PKB/Akt, en réponse à l'insuline, phosphoryle et inhibe la Glycogen synthase kinase (GSK3), enzyme responsable de la régulation de l'activité de la glycogène synthase (GS). Cette levée d'inhibition sur la GS a pour conséquence d'activer la GS et de stimuler la synthèse de glycogène (Bollen et al., 1998) (détails dans le chapitre II.2.2 « Synthèse de glycogène »).

➤ *Maintien de la balance azotée*. L'insuline exerce une action anabolique importante au niveau musculaire et hépatique *via* deux voies : (i) l'insuline stimule la synthèse protéique à partir des acides aminés plasmatiques et (ii) inhibe le catabolisme protéique et la gluconéogenèse à partir d'acides aminés glucoformateurs. L'insuline, *via* la stimulation de la voie « PI3K/PKB/Akt », stimule la synthèse protéique, en levant l'inhibition sur mTORC1. mTORC1 est maintenu inactivé par le complexe hétérodimérique tuberous sclerosis complex (TSC1/ 2) d'une part, et par la protéine proline-rich Akt substrate of 40kDa (PRAS40) d'autre part. En réponse à l'insuline, la PKB/Akt phosphoryle à la fois le complexe TSC1/2, et la PRAS40, ce qui enlève leur inhibition sur la mTORC1, stimulant ainsi la synthèse protéique. L'activité kinase de mTOR permet de phosphoryler et d'activer la protéine ribosomale S6 kinase p70S6K (S6kinase), et de phosphoryler et d'inhiber le facteur eIF4E binding protein (4EBP1, inhibiteur du facteur d'initiation eIF4E) (Weigl, 2012). Ce qui stimule la synthèse protéique en augmentant le niveau général de la traduction des ARNm (détails dans le chapitre II.2.3 synthèse protéique).

➤ *Lipogenèse*. La lipogenèse est stimulée *via* la Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1-C), dont la localisation subcellulaire est sous contrôle de l'axe « PI3K /PKB/Akt/mTORC1 ». L'activation de mTORC1 permet au facteur transcriptionnel SREBP-1c d'être transloqué vers le noyau et de se lier au promoteur de deux enzymes clés de la voie lipogénique: l'Acétyl CoA carboxylase (ACC) et la Fatty acyl synthase (FAS) et de favoriser leur transcription (Shimano et al., 1999).

➤ *Néoglucogénèse*. La néoglucogénèse est inhibée par deux enzymes clés, la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Sasaki and Granner, 1988) et la glucose-6-



phosphatase (G6Pase) (Streeper et al., 1997; Dickens et al., 1998). Ces deux enzymes, codées à partir des gènes (Pck1 et G6pc), sont des enzymes limitantes de la gluconéogenèse (Cherrington et al., 1998; Girard, 2006). Elles sont induites au cours du jeûne et du diabète insulino-déficient et leur expression est normalisée par la réalimentation ou un traitement à l'insuline dans les trois tissus néoglucogéniques (foie, reins et intestin grêle)(Mithieux et al., 2009). La transcription des deux gènes Pck1 et G6pc est régulée, entre autre, par un facteur transcriptionnel appelé FOXO1 (Forkhead box O1), qui, lorsqu'il n'est pas phosphorylé par la PKB/Akt, est localisé dans le noyau et active la transcription (au cours du jeûne). En réponse à l'insuline, la PKB/Akt est activée et elle phosphoryle FOXO1 (Stitt et al., 2004). FOXO1 migre alors vers le cytosol où il est séquestré par la protéine 14-3-3 et la transcription du gène de la PEPCK et G6Pase est inhibée (Jiang et al., 2003; Halse et al., 2001; Hashiramoto and James, 2000).

➤ *L'insuline, via la PKB/Akt inhibe la glycogénolyse* dans le foie en inhibant la glycogène phosphorylase, enzyme qui convertie le glycogène en glucose (Aiston et al., 2003) (détails dans le chapitre II.2.2 « Synthèse de glycogène »).

➤ *Lipolyse.* L'hydrolyse des triglycérides nécessite l'intervention de trois enzymes : l'adipose triglycéride lipase (ATGL), la lipase hormono-sensible (HSL), et la monoglyceride lipase (MGL). Les trois enzymes sont impliquées dans une étape différente de l'hydrolyse des triglycérides. L'insuline régule négativement la lipolyse dans les adipocytes par une voie de signalisation PKB/Akt-indépendante en agissant sur la HSL. En période de jeûne, la PKA, activée par le second messenger Adénosine monophosphate cyclique (AMPC), phosphoryle les résidus Ser 649 et Ser 650 de la lipase hormono sensible (HSL), entraînant ainsi l'activation de l'enzyme (Anthonsen et al., 1998). En période post prandiale, l'insuline diminue l'activité de la HSL en assurant l'hydrolyse de l'AMPC en 5'AMP, *via* la phosphorylation et l'activation de la phosphodiesterase PDE-3B par la PKB/Akt.

#### Régulation négative de la PKB/Akt

L'activité de la PKB/Akt peut être complètement inhibée par déphosphorylation de ses deux résidus Sérine 473 et Thréonine 308. Cette régulation est assurée par deux phosphatases : la protéine phosphatase 2 A (PP2A), et la PH-domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP, '*flip*').

En période post-prandiale, l'insuline maintient la PP2A inactivée par l'insuline par la phosphorylation sur son résidu Tyrosine 307, situé dans son domaine catalytique (Begum and Ragolia, 1996). En revanche, lorsque l'action de l'insuline diminue avec le temps, l'effet inhibiteur de l'insuline sur la PP2A disparaît, permettant cette dernière de déphosphoryler le résidu Thréonine 308 de la PKB/Akt (Cazzolli et al., 2001). Le mécanisme de déphosphorylation de la PKB/Akt par la PP2A dans des conditions physiopathologiques est détaillé dans le chapitre « Mécanisme d'action des céramides ».

Les phosphatases PHLPP1 et PHLPP2 appartiennent à la famille des Ser/Thr phosphatases. Elles sont principalement activées et agissent comme des suppresseurs de tumeur dans certains cancers (cancer du côlon, du foie, de la prostate, ...) (Brognard and Newton, 2008). Dans ces conditions, la déphosphorylation du résidu Sérine 473 de la PKB/Akt est réalisée par les deux isoformes PHLPP1 et PHLPP2. La PHLPP2 déphosphoryle la PKB $\alpha$ /Akt1 et la PKB $\gamma$ /Akt3 et la PHLPP1 déphosphoryle la PKB $\beta$ /Akt2 et la PKB $\gamma$ /Akt3 (Gao et al., 2005; Warfel and Newton, 2012).

- ***Protéines Kinases C atypiques***

Les protéines kinases C (PKCs) forment une grande famille appartenant aux protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA/PKG, PKC, AGC). Elles jouent un rôle important dans de nombreux événements de signalisation intracellulaire, croissance et différenciation cellulaire (Steinberg, 2008). Les PKCs sont regroupées selon trois classes distinctes: conventionnelles (regroupant les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), nouvelles (regroupant les isoformes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  et  $\mu$ ) et atypiques (regroupant les isoformes  $\lambda$ ,  $\delta$  et  $\eta$ ) (Farese, 2002; Schmitz-Peiffer, 2002). Alors que les formes conventionnelles et nouvelles des PKC requièrent le diacylglycérol et/ou le calcium pour leur activation, les formes atypiques, insensibles au diacylglycérol et au calcium, nécessitent plutôt les phosphoinositides (PI-3,4,5-P<sub>3</sub> produits par la PI3K en réponse à l'insuline) pour être activées (Schmitz-Peiffer, 2002; Farese, 2002).

À l'état basal, les PKC atypiques existent sous une forme repliée pour prévenir la phosphorylation de leurs substrats, mais également de la protéine elle-même (Farese, 2002). Toutes les PKCs possèdent une séquence pseudo-substrat auto-inhibitrice (PS) qui est attachée au domaine catalytique, bloquant ainsi l'accès d'un substrat au domaine kinasique à l'état basal (Farese, 2002). L'activation des PKC atypiques nécessite en premier lieu la liaison du PIP<sub>3</sub> sur certaine(s) région(s) encore non-définie(s) de l'extrémité régulatrice, permettant ainsi un dépliement de la protéine (Standaert et al., 1999; Standaert et al., 2001). Ce changement de conformation des PKC atypiques les rend aptes à être phosphorylées par la

PDK-1 dans la boucle d'activation du domaine catalytique (Thr410 pour PKC- $\delta$  et Thr403 pour PKC- $\lambda$ ), tout en permettant l'autophosphorylation et/ou la transphosphorylation de certains résidus thréonine à l'intérieur du domaine catalytique, dont le résidu Thr560 (Standaert et al., 1999; Standaert et al., 2001).

Ces modifications indépendantes (changement de conformation) et dépendante de phosphorylation (Thr410 *via* la PDK-1 et Thr560 *via* autophosphorylation) sont importantes pour une activation optimale et maximum des PKC atypiques (Farese, 2002; Standaert et al., 2001). L'activation des PKC atypiques serait aussi dépendante de Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) (Standaert et al., 2004; Liu et al., 2003).

Notons aussi que les PKC atypiques peuvent également être activées par clivage protéolytique de leur extrémité N-terminale, convertissant ainsi l'enzyme en une forme constitutivement active, appelée kinase de type M (Ishizuka et al., 1990). Cependant, l'importance de ce dernier mécanisme d'activation demeure cependant très peu étudiée.

L'activation des PKC atypiques en réponse à l'insuline semble jouer un rôle important dans la régulation du transport de glucose (rôle controversé, voir plus bas).

De plus, dans des conditions physiopathologiques, les PKC atypiques induisent l'expression de SREBP-1C (steroid regulatory element-binding protein-1c) et de NF $\kappa$ B (Sajan et al., 2009) au niveau du niveau hépatique, et au niveau musculaire les PKC atypiques interagissent avec PKB/Akt pour inhiber la voie de signalisation insulinaire (Powell et al., 2003).

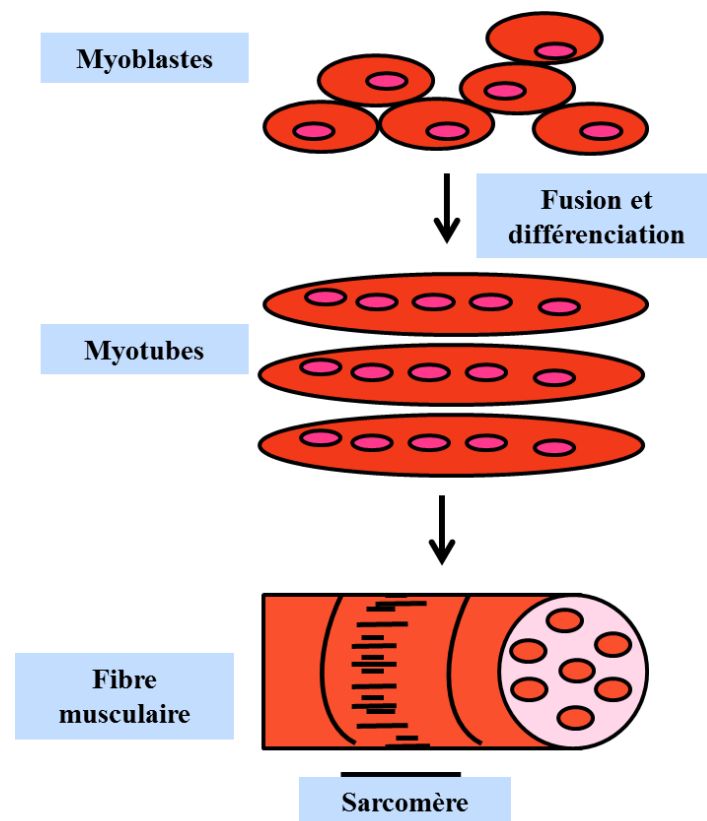
## ***II. Muscle squelettique: organe clé dans l'homéostasie glucidique***

### ***II.1 Structure du muscle squelettique***

Le terme « muscle » vient du mot latin *musculus* qui signifie « petite souris ». Pour le sens de « muscle », l'analogie perdure en français où la *souris* désigne un muscle précis dans le gigot. Les muscles sont considérés comme « les moteurs » de l'organisme. Les propriétés des muscles (excitabilité, contractilité, élasticité...) leur permettent de générer force et mouvement. Parmi les 652 muscles du corps humain, 3 types de fibres permettent de les classer : les muscles striés, les muscles lisses et le muscle cardiaque. À l'état basal, la contribution du muscle squelettique dans le captage total du glucose est d'environ 30%, et de plus de 80% après un repas. Ce tissu est donc très important pour limiter l'ampleur et la durée des hyperglycémies postprandiales.

Le nombre de muscles striés dans le corps humains est d'environ 600 (ce nombre varie selon les descriptions des auteurs) et ils représentent 42% du poids du corps chez l'homme, 38% chez la femme. Les muscles squelettiques striés sont constitués de faisceaux musculaires formés eux même d'un ensemble de fibres musculaires.

La fibre musculaire, cellule multinucléée allongée, résulte de la fusion de plusieurs cellules non différenciées à noyaux uniques, appelées myoblastes. Le myotube, formé par la fusion des myoblastes, est caractérisé par des noyaux à position centrale. Les fibres striées sont des cellules composées elles-mêmes de petites unités appelées myofibrilles. Chaque myofibrille est implantée dans le cytoplasme de la cellule. Ce cytoplasme est appelé sarcoplasme. Tout le contenu de la cellule est enveloppé dans une membrane plasmique: le sarcolemme (Mauro, 1961) (figure 2).



**Figure 2: Structure de la fibre musculaire**

Le muscle squelettique est composé d'un ensemble de fibres. Chaque fibre est formée par la fusion de cellules mononuclées appelées myoblastes qui se différencient pour donner des myotubes. Les sarcomères sont les unités structurales formant les fibres.

Des méthodes histochimiques basées sur l'étude des enzymes du métabolisme musculaire permettent de distinguer différents types de fibres musculaires:

**(i) Les fibres de type I** à *contraction lente* ou fibres rouges. Elles sont également appelées fibres musculaires oxydatives, car elles utilisent principalement les lipides comme source d'énergie. Ces fibres possèdent une capacité aérobie élevée et ne recourent que très peu au métabolisme anaérobie. Elles doivent ces caractéristiques à une forte vascularisation et une densité élevée de mitochondries. Ce sont donc des fibres très endurantes; elles se contractent lentement, ne déploient pas une très grande puissance, mais peuvent se contracter longtemps puisqu'elles puisent l'ATP nécessaire à leur fonctionnement dans le métabolisme aérobie. Ce dernier, en effet, ne produit pas d'acide lactique et utilise des sources d'énergie variées comme le glycogène musculaire et hépatique, les acides gras libres et parfois des acides aminés (Schiaffino and Reggiani, 2011). Ces fibres possèdent peu de réserves de glycogène, mais peuvent entreposer d'appréciables quantités de lipides sous forme de gouttelettes intracellulaires. Les fibres oxydatives lentes comme celles du muscle soléaire, sont utilisées pour des activités d'endurance, des mouvements lents et répétitifs, comme la marche ou la course à basse vitesse ou bien le maintien de la posture.

**(ii) Les fibres de type IIA** sont des fibres intermédiaires oxydatives à *contraction rapide* et résistantes à la fatigue. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires mais, elles possèdent une coloration intermédiaire (fibres intermédiaires). Elles se retrouvent généralement en grand nombre dans les muscles de la jambe des athlètes. Par exemple les muscles épitrochléens sont sollicités lors d'exercices brefs mais intenses.

**(iii) Les fibres de type IIB** sont des fibres glycolytiques à *contraction rapide* et sensibles à la fatigue. Ces fibres contiennent peu de myoglobine, de mitochondries et de capillaires (fibres blanches). Elles ont une haute teneur en glycogène et possèdent le plus grand diamètre. On les retrouve en grand nombre dans les muscles du bras.

De nombreuses fibres IIA peuvent évoluer vers un type I à la suite d'exercice prolongé et modéré (entraînement endurant). En revanche des exercices brefs et intenses provoquent l'évolution des fibres IIA vers le type IIB (fibres rapides) (Luginbuhl et al., 1984).

## ***II.2 Les fonctions métaboliques des muscles squelettiques***

L'homéostasie glucidique correspond à l'ensemble des mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires qui œuvrent pour ajuster étroitement la glycémie entre 0.8 et 1.2g/L.

Lors d'un repas, les muscles sont les principaux organes qui permettent de maintenir la glycémie à l'équilibre, et en période postprandial, 75% du glucose circulant est pris en charge par les muscles pour y être métabolisé et pour donner immédiatement de l'énergie ou pour être stocker sous forme de glycogène.

Une autre source d'énergie musculaire est les acides gras. Une fois entrés dans le muscle, ils peuvent être stockés sous forme de triglycérides dans des gouttelettes lipidiques, oxydés pour fournir de l'énergie préférentiellement dans les fibres musculaires de type 1, ou être transformés en lipides plus complexes comme les sphingolipides, dérivés lipidiques indispensables pour l'intégrité des structures membranaires des cellules et la transmission de messages intracellulaires.

De plus, le muscle squelettique offre la plus grande réserve de protéines (Rennie et al., 2004).

### ***II.2.1 Transport de glucose***

Dans des conditions basales (pendant un jeûne et au repos), environ 80% du glucose est métabolisé indépendamment de l'insuline par le cerveau, l'intestin, et les globules rouges, alors que les tissus insulino-sensibles (muscle, tissu adipeux, et foie) en nécessitent seulement de petites quantités. Les muscles squelettiques constituent un site majeur d'utilisation du glucose en période postprandiale, mais également durant la contraction musculaire puisque le glucose constitue sa principale source énergétique. En effet, la sécrétion élevée d'insuline suite à l'ingestion d'aliments contribue à l'augmentation du captage musculaire de glucose (Baron et al., 1988). Durant un clamp euglycémique/hyperinsulinémique, il a été montré que le muscle squelettique était responsable de 80% du captage total du glucose par l'organisme (DeFronzo et al., 1981).

Paradoxalement, la sécrétion d'insuline diminue durant l'exercice (Vinten and Galbo, 1983) alors que l'augmentation du transport musculaire de glucose est déterminante et essentielle pour fournir suffisamment d'ATP pour répondre aux besoins énergétiques de la cellule musculaire en activité. Ainsi, le captage de glucose au niveau musculaire n'est pas seulement stimulée par l'insuline, mais aussi par la contraction musculaire pour réguler la glycémie d'une part et fournir de l'énergie de l'autre part.

*i) La famille GLUT des transporteurs de glucose*

Le transport du glucose à travers les membranes lipidiques a été démontré depuis longtemps comme étant l'étape limitante de son métabolisme (Kubo and Foley, 1986). Puisque le glucose est une molécule très peu liposoluble, il ne peut pas entrer dans les cellules par simple diffusion. Son transport à travers les membranes est donc assuré par des transporteurs spécifiques. Deux types de transport existent.

Le premier est un transport actif qui s'effectue *via* les symports ( $\text{Na}^+$ /glucose). Ce type de transport est réalisé par les transporteurs de la famille SGLT (Sodium/Glucose Co-Transporteurs), SGLT1 et SGLT2 qui utilisent le gradient transmembranaire de  $\text{Na}^+$  généré par la pompe à sodium et nécessitent un apport d'énergie (Zhao and Keating, 2007). Ce type de transport est utilisé au niveau de l'intestin grêle et les reins (Wood and Trayhurn, 2003; Scheepers et al., 2004).

Le deuxième type de transport est un transport facilité assuré par 14 membres de la famille des transporteurs de glucose GLUT (pour GLUcose Transport) qui forment un port (uniport) à travers la membrane plasmique par lequel le glucose peut entrer. Ce transport ne nécessite pas d'apport d'énergie et s'effectue dans le sens du gradient de concentration. Les GLUT sont classifiés selon leurs structures et leurs fonctions : classe 1 (GLUTs 1-4, 14) ; classe 2 (GLUTs 5, 7, 9 et 11) et classe 3 (GLUTs 6, 8, 10, 12) (Joost et al., 2002) (tableau 3).

Isoforme	Classe	Localisation	Insulino-sensible	Transport	Dans le muscle squelettique
GLUT1	I	Ubiquitaire	Non	Glucose	Oui
GLUT2	I	Foie, pancréas, intestin, reins	Non	Glucose; fructose, galactose	Non
GLUT3	I	cerveau	Non	glucose	Non
GLUT4	I	Muscle, TAB, cerveau	Oui	glucose	Oui
GLUT5	II	Intestin, reins	Non	Fructose; glucose	Oui
GLUT6	III	Cerveau, leucocytes	Non	glucose	Non
GLUT7	II	Intestin grêle, colon, testicules	Non	Glucose, fructose	Non
GLUT8	III	Cerveau, testicules	Non	glucose	Oui
GLUT9	II	Foie, reins	n.d	Glucose, fructose	Non
GLUT10	III	Foie, pancréas	Non	glucose	Oui
GLUT11	II	Cœur, muscle	Non	Glucose; fructose	Oui
GLUT12	III	Cœur, muscle, TAB, intestin grêle, prostate	Oui	Glucose	Oui
GLUT13	III	Cerveau	Non	H <sup>+</sup> -myo-inositol	Non
GLUT14	I	Testicules	Non	Orphane	Non

**Tableau 3: Famille de transport facilité GLUT.**

Classification, distribution et fonctions des isoformes GLUT.

Bien qu'initialement caractérisées comme transporteurs de glucose, certaines protéines appartenant à la même famille se sont avérées pouvoir aussi transporter d'autres sucres. Par exemple, GLUT2 transporte non seulement le glucose mais aussi le fructose et le galactose alors que GLUT5 ne transporte spécifiquement que le fructose (Zhao and Keating, 2007). De plus, GLUT7, GLUT9, et GLUT11 transportent le glucose et le fructose (Zhao and Keating, 2007).

GLUT4 est le transporteur de glucose principalement exprimé dans les tissus répondant à l'insuline (muscles squelettiques, cardiaques et adipocytes) (Thorens and Mueckler, 2010). On le retrouve aussi exprimé dans une moindre mesure dans des régions spécifiques du



cerveau (dans le système nerveux central, principalement le cerebellum, l'hypothalamus et l'hippocamp) (Leloup et al., 1996; McEwen and Reagan, 2004).

Sur la base de données obtenues en quantifiant leurs ARNm, GLUT4, GLUT5 et GLUT12 sont exprimés dans le muscle squelettique à des niveaux plus élevés que GLUT1, GLUT3, GLUT8, et GLUT11 (Stuart et al., 2006).

Bien que GLUT12 soit aussi beaucoup exprimé dans les fibres musculaires de type I (Stuart et al., 2006), les transporteurs GLUT1 et GLUT4 sont cependant les transporteurs les mieux caractérisés au niveau musculaire.

**GLUT1**, codé par le gène SLC2A1, fut le premier transporteur membranaire purifié et cloné dans les cellules de mammifères (Mueckler et al., 1985). Son expression a été observée dans plusieurs tissus, principalement au niveau du placenta, du cerveau, des érythrocytes, des reins, mais aussi à niveau moindre dans les tissus insulino-sensibles (les muscles squelettiques et cardiaques ainsi que les tissus adipeux blanc et brun). De façon générale, l'expression de GLUT1 est augmentée en réponse à une variété de stimuli qui favorisent la croissance ou la division cellulaire requérant davantage d'énergie comme l'insuline, les hormones thyroïdiennes et de croissance, ainsi que certains oncogènes (Birnbaum et al., 1987; Tai et al., 1990; Tordjman et al., 1989; Weinstein et al., 1990). Par contre, le glucose a un effet contraire sur l'expression de cet isoforme (Walker et al., 1988; Wertheimer et al., 1991).

Dans les muscles squelettiques, GLUT1 représente environ 3 à 5 % du nombre total des transporteurs de glucose (Zorzano et al., 1989). Il est localisé principalement dans la membrane plasmique des cellules et est responsable du transport de glucose basal (Zorzano et al., 1989; Marette et al., 1992). Peu de translocation de GLUT1 n'a été observée dans le muscle squelettique en réponse à l'insuline ou lors de la contraction musculaire, sa localisation étant presque exclusivement associée à la membrane plasmique, et absente au niveau des tubules transversaux et des membranes internes (Douen et al., 1990b; Zorzano et al., 1989).

De plus, un niveau d'expression supérieur de GLUT1 a été observé dans les fibres musculaires oxydatives de type I comparativement aux fibres glycolytiques de type II (Goodyear et al., 1991).

**GLUT4** représente plus de 90% de la totalité des transporteurs de glucose exprimés dans les muscles squelettiques et cardiaques, ainsi que dans les tissus adipeux blanc et brun (Holman et al., 1990). GLUT4 est le transporteur principalement responsable de l'augmentation du captage du glucose induit par l'insuline dans les tissus insulino-sensibles ou en réponse à la contraction musculaire. En effet, l'importance de la contribution de GLUT4 dans le captage

du glucose est étayée par le fait que la translocation de GLUT4 est bien supérieure à celle de GLUT1 dans les cellules adipeuses et les cellules musculaires en réponse à l'insuline (Holman et al., 1990).

Au niveau musculaire, la distribution de GLUT4 diffère selon le type de fibre musculaire. En effet, des études ont montré que GLUT4 est quatre fois plus abondamment exprimé dans les fibres musculaires oxydatives (type I) que dans les fibres glycolytiques (type II) (Goodyear et al., 1991), ce qui pourrait expliquer que les fibres oxydatives soient davantage sensibles à l'effet de l'insuline et de la contraction musculaire que les fibres glycolytiques (Ploug et al., 1987; Song et al., 1999).

Dans des conditions basales, la réserve de GLUT4 est maintenue dans des vésicules membranaires intracellulaires appelées vésicules de stockage de GLUT4 (GSV) (Bryant and Gould, 2011). Lors d'un stimulus insulinaire, la translocation de ces vésicules vers la membrane plasmique permet l'absorption du glucose par les cellules. Le processus de translocation de GLUT4 a bien été établi et nécessite l'action de protéines impliquées dans le trafic vésiculaire (Thorens and Mueckler, 2010). Ces protéines sont présentes au niveau de la membrane des vésicules intracellulaires contenant ces transporteurs, mais aussi au niveau de la membrane plasmique, permettant ainsi la fusion de des vésicules avec la membrane plasmique (Kawanishi et al., 2000; Bryant et al., 2002).

## *ii) Transport de glucose au niveau du muscle squelettique*

### Translocation des vésicules GLUT4 vers la membrane plasmique

La translocation du cytoplasme à la membrane plasmique des vésicules contenant GLUT4 utilise le réseau d'actine et les microtubules (Stockli et al., 2010). En effet, des études suggèrent un rôle important du remodelage du cytosquelette d'actine durant le trafic vésiculaire (Chiu et al., 2011), la moindre perturbation dans ce processus altérant la translocation des vésicules vers la membrane plasmique (Tong et al., 2001; Habegger et al., 2012). Rac1, qui appartient à la famille Rho GTPase, a été identifié comme induisant le réarrangement dynamique des filaments d'actine sous la membrane plasmique dans les cellules musculaires (JeBailey et al., 2007; Ueda et al., 2008) et son activité est régulée par l'insuline dans les muscles des rongeurs et chez l'homme (SyLOW et al., 2013; Ueda et al., 2010). Afin de réorganiser les filaments d'actine, Rac1 recrute des facteurs nucléaires pour stimuler la polymérisation d'actine. Parmi ces facteurs nucléaires, ceux de la famille WASp ont été identifiés (Ridley, 2006). WASp se lie et active le complexe ARP2/3 qui catalyse la

formation des filaments d'actine (Pollard, 2007). Ce processus a été montré comme étant sous la dépendance de Rac1 dans les cellules musculaires (Chiu et al., 2010).

Si l'activation de Rac 1 est PI3K dépendante (Chiu et al., 2010; Rudich and Klip, 2013), l'implication de la PKB/Akt dans ce processus reste incertaine (Ueda et al., 2008; Nozaki et al., 2013; Chiu et al., 2013).

L'insuline induit aussi la translocation de GLUT4 au niveau d'un second compartiment de surface, les tubules-T et ce, tant au niveau des fibres musculaires oxydatives que glycolytiques (Dohm et al., 1993; Marette et al., 1992).

### Fusion des vésicules GLUT4 à la membrane plasmique

Depuis de nombreuses années, des efforts ont été déployés pour comprendre le mécanisme par lequel les vésicules de GLUT4 fusionnent avec la membrane plasmique dans les cellules insulino-sensibles en réponse à l'hormone. L'idée selon laquelle le mécanisme de ciblage et de fusion des vésicules contenant le transporteur de glucose avec la membrane plasmique pouvait partager des similitudes avec le mécanisme déjà bien caractérisé de neurosécrétion s'est imposée, car les protéines impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques avaient aussi été décrites dans les tissus insulino-sensibles (Bakirtzi et al., 2009). La compréhension du mécanisme de fusion des vésicules synaptiques est basée sur le modèle décrit par James Rothman et ses collègues et qui est maintenant bien connu sous le nom d'hypothèse SNARE (pour soluble N- N-ethylmaleimide -sensitive factor attachment protein receptor) (Rothman and Warren, 1994).

Qu'en est-il de l'implication des SNAREs dans la translocation de GLUT4 ? L'évidence de l'implication fonctionnelle des SNAREs a presque principalement été obtenue à partir d'études réalisées dans des adipocytes. En inhibant VAMP-2 et VAMP-3 par les toxines tétaniques et botuliques dans des adipocytes 3T3-L1 perméabilisés, on réduit la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique en réponse à l'insuline. De plus, l'introduction massive de protéine recombinante syntaxine-4 ou d'anticorps anti-syntaxine-4 dans des adipocytes a aussi permis d'inhiber la translocation de GLUT4, démontrant que ces protéines pourraient participer à la régulation du trafic du transporteur dans ces cellules.

Récemment, le groupe de D. James a montré que la présence d'un autre vSNARE, VAMP-8, était nécessaire pour le recrutement des vésicules de GLUT4 à la membrane plasmique des adipocytes en réponse à l'insuline (Zhao et al., 2009). En utilisant des souris dont l'expression de VAMP8 a été invalidée, combiné à l'utilisation de toxine clostridium (pour cliver VAMP2 et VAMP3, VAMP8 étant insensible à ces toxines), cette étude a mis en évidence que la

présence d'un des trois vSNAREs, VAMP-2, VAMP-3 et VAMP-8 présents dans les vésicules de GLUT4 était suffisante pour recruter ces vésicules à la membrane plasmique en réponse à l'insuline dans les adipocytes. Eliminer un ou deux d'entre eux ne suffit pas pour contrecarrer à 100% l'action de l'insuline sur les vésicules (Zhao et al., 2009). Les auteurs suggèrent donc que les trois vSNAREs peuvent opérer de façon interchangeable, mais aussi coopérative pour diriger les vésicules de GLUT4 vers les tSNAREs de la membrane plasmique des adipocytes.

### *iii) Mécanismes de régulation du transport de glucose dans le muscle squelettique*

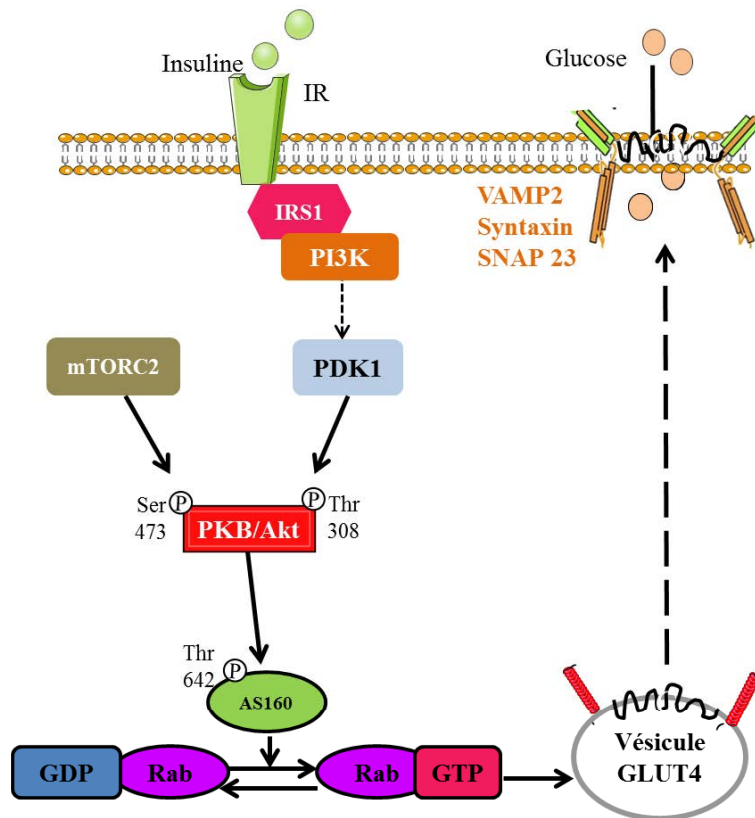
#### *a) Mécanismes insulino-dépendant.*

La voie PI3K joue un rôle clé dans le transport de glucose en réponse à l'insuline dans les tissus insulino-sensibles (Kotani et al., 1995; Clarke et al., 1994; Farese, 2001; Frevert and Kahn, 1997; Hara et al., 1994; Litherland et al., 2001; Tanti et al., 1996). Plusieurs études ont mis en évidence que la PKB/Akt participait au transport de glucose médié par l'insuline en jouant un rôle crucial dans la translocation des vésicules contenant GLUT4 vers la membrane plasmique.

Une fois activée en réponse à l'insuline, la PKB/Akt va phosphoryler d'autres substrats comme une protéine de 160 kDa appelée AS 160 (ou TBC1D4) et son proche parent Tre-2/BUB2/cdc 1domaine 1 (TBC1D1) (Taylor et al., 2008; Bruss et al., 2005). Ces deux protéines vont directement réguler les flux entrant de glucose en contrôlant la translocation à la membrane plasmique du transporteur de glucose GLUT4 en réponse à l'insuline (Cartee, 2015).

La phosphorylation de TBC1D1 et de l'AS160 par la PKB/Akt en réponse à l'insuline a pour conséquence d'inhiber le domaine activateur de l'activité GTPase ("GTPase-activating domain" - GAP) de TBC1D1 et de l'AS160, domaine dont le rôle est d'augmenter l'hydrolyse du GTP par les protéines Rab. Dans le génome humain, plus de 60 familles de Rab GTPases ont été identifiées. Elles sont impliquées dans la régulation du trafic membranaire intracellulaire, telles que le trafic entre différents organelles intracellulaires (Grosshans et al., 2006; Zerial and McBride, 2001). Rab8A, Rab10 et Rab13, impliqués dans la régulation du trafic des vésicules contenant GLUT4 en réponse à l'insuline dans le muscle squelettique (Rab8A et Rab13) et dans le tissu adipeux (Rab10) (Kaddai et al., 2008; Bogan, 2012), ont été caractérisés comme substrats de AS160 (Sano et al., 2007; Sun et al., 2010). L'inhibition des domaines GAP de TBC1D1 et de l'AS160 en réponse à l'insuline a pour conséquence une activité GTPase diminuée des protéines Rab. Or les protéines Rab sont plus actives sous leur

forme Rab-GTP que sous leur forme Rab-GDP. La conséquence de la diminution de leur activité GTPase sera donc une perte de rétention des vésicules contenant GLUT4 à l'intérieur des cellules et leur translocation vers la membrane plasmique (Thorens and Mueckler, 2010) (figure 4).



**Figure 4: Translocation insulino-stimulée des vésicules intracellulaires contenant GLUT4.**

L'insuline induit une cascade de signalisation conduisant à l'activation de la PKB/Akt (phosphorylation du résidu sérine473 par le complexe mTORC2 et du résidu thréonine 308 par PDK1). La PKB/Akt activée par l'insuline phosphoryle et inactive l'AS160 (Akt substrate 160), induisant ainsi la phosphorylation de protéines Rab-GDP et la libération des vésicules contenant GLUT4 vers la membrane plasmique. Grâce aux protéines SNARE, les vésicules fusionnent à la membrane plasmique, libérant ainsi GLUT4.

Certaines études suggèrent que les PKC atypiques constituent aussi un second effecteur agissant en aval de la PI-3 kinase pour stimuler le transport du glucose insulino-dépendant dans les cellules musculaires et adipeuses (Bandyopadhyay et al., 2000; Kotani et al., 1998; Standaert et al., 1997).

L'implication des PKC atypiques dans la translocation de GLUT4 en réponse à l'insuline a été confirmée en surexprimant des mutants dominant négatifs de la PKC $\delta$  et de la PKC $\lambda$  (dans les adipocytes et les muscles respectivement) (Farese, 2002), en inhibant l'activité de PKC  $\delta$  via un inhibiteur chimique dans les adipocytes (Liu et al., 2010), ou bien chez les souris dont l'expression de la PKC  $\lambda$  a été invalidée dans le muscle (Farese et al., 2007). Toutes ces études montrent que l'activation des PKC atypiques est nécessaire pour la propagation du signal insulinique vers les réserves intracellulaires de GLUT4.

Cependant, il faut noter que l'implication des PKCs atypiques dans ce processus n'est pas un phénomène universellement accepté. Récemment, une étude a montré que dans des cellules musculaires L6 dont l'expression de la PKC $\lambda$  (isoforme exprimée majoritairement dans ces cellules) a été inhibée, le transport de glucose stimulé par l'insuline n'était pas affecté (Stretton et al., 2010). Des études complémentaires seront donc nécessaires pour déterminer si ces PKCs jouent vraiment un rôle dans la transmission du signal insulinique.

#### Régulation du signal insulinique *via* des phosphatases lipidiques

SHIP2 (Src homology 2 domain containing inositol 5' phosphatase 2) et PTEN (phosphatase and TENsin homologue supprimé sur le chromosome 10, appelée aussi MMAC1 ou TEP1) sont deux phosphatases régulant négativement la voie de signalisation insulinique (Sasaoka et al., 2005) (figure 5).

SHIP2 et PTEN ont été montrées comme étant des régulateurs négatifs de la voie PI3K (Sasaoka et al., 2006) en hydrolysant le PIP<sub>3</sub>, second messenger lipidique essentiel pour la propagation du signal de l'insuline. De plus, leur expression/activité est augmentée dans les tissus musculaires et adipeux insulino-résistants (Sasaoka et al., 2005).

**PTEN** est une phosphatase clonée il y a presque 20 ans (Li and Sun, 1997; Steck et al., 1997) qui catalyse la déphosphorylation des PIP<sub>3</sub> en position 3' du cycle inositol, entraînant ainsi une diminution des concentrations de ces phospholipides et une réduction parallèle de l'activité de la PKB/Akt (Cantley and Neel, 1999; Maehama and Dixon, 1998).

PTEN agit comme un suppresseur de tumeur par son action phosphatasique et est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, empêchant les cellules de se multiplier trop rapidement. PTEN est retrouvée mutée dans un grand nombre de cancers, y compris des glioblastomes, des carcinomes du sein et de la prostate (Di and Pandolfi, 2000; Li et al., 1997). Le Knockout d'un allèle du gène PTEN chez la souris conduit à une augmentation de l'incidence d'apparition de tumeurs dans différents tissus (Podsypanina et al., 1999; Suzuki et al., 1998), et sa re-expression dans des lignées n'exprimant pas PTEN entraîne l'induction de l'apoptose

ou l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, en fonction des types cellulaires analysés (Cantley and Neel, 1999).

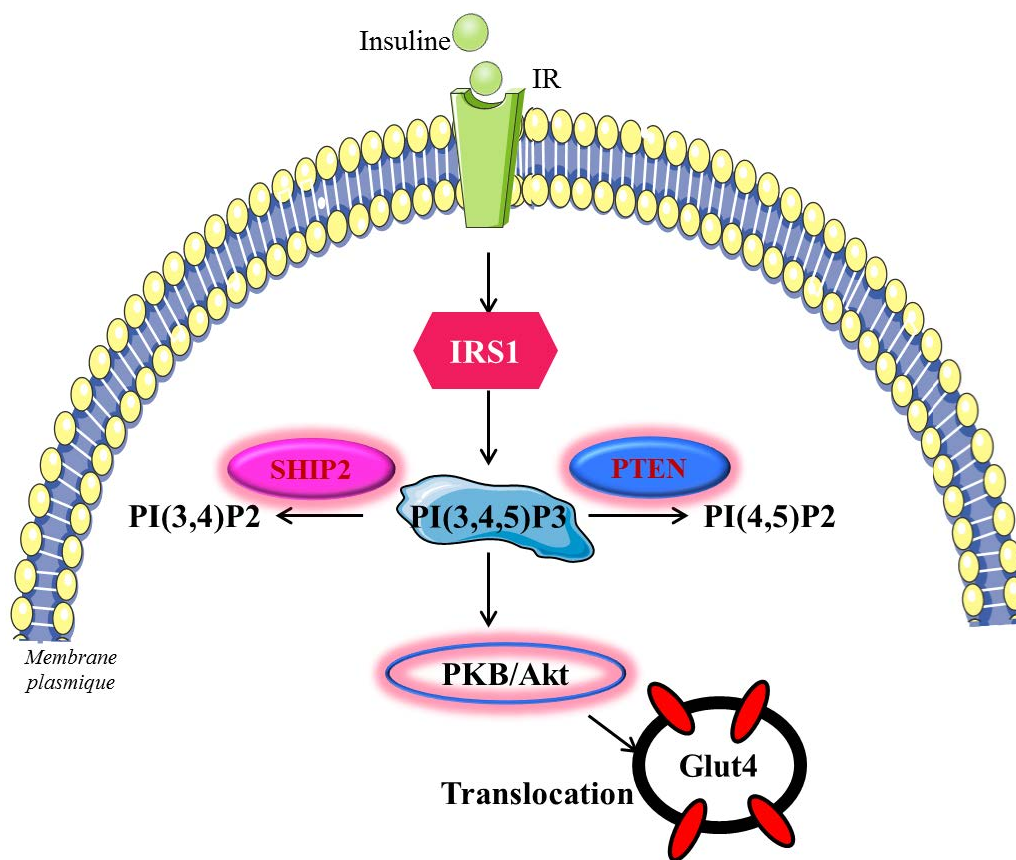
L'implication de PTEN dans la régulation de la sensibilité à l'insuline des cellules est maintenant claire. En effet, l'équipe de Nakashima a montré que la surexpression de PTEN par un adénovirus dans les adipocytes 3T3-L1 inhibe la signalisation insulinique (Nakashima et al., 2000) et que la diminution de l'expression de PTEN dans la même lignée par l'intermédiaire d'un RNAi améliore la phosphorylation de PKB/Akt par l'insuline et augmente le transport de glucose (Tang et al., 2005). De même, des études réalisées *in vivo* et *in vitro* dans le muscle squelettique de souris invalidées pour PTEN et dans des myotubes C2C12 démontrent un impact négatif de PTEN sur la sensibilité à l'insuline (Wijesekara et al., 2005). Enfin, une étude menée chez des souris dont un allèle de PTEN est invalidé (PTEN +/-) montre que ces animaux présentent une hypersensibilité à l'insuline et un transport de glucose amélioré (Wong et al., 2007).

**SHIP2** est une phosphatase lipidique qui hydrolyse le phosphate en position 5' du cycle inositol de PIP3 (Damen et al., 1996; Lioubin et al., 1996) induisant ainsi une diminution des concentrations intracellulaires PIP3 (comme PTEN).

SHIP est principalement exprimée dans des cellules hématopoïétiques, mais aussi dans les tissus insulino-sensibles (Rohrschneider et al., 2000). Son activité de déphosphorylation des PIP3 entraîne l'inhibition de plusieurs voies de signalisation, y compris la voie PI3K/PKB/Akt (Aman et al, 1998; Bolland et al, 1998), et conduit à l'inhibition de la prolifération des cellules hématopoïétiques et de la survie cellulaire (Lioubin et al., 1996; Liu et al., 1997). La perte de l'expression de SHIP2 *in vivo* induit une activation importante de la PKB/Akt dans les mastocytes dérivés de la moelle osseuse en réponse à une stimulation par des cytokines (Liu et al., 1999a).

Plusieurs études décrivent l'importance de SHIP2 comme régulateur négatif de la voie insulinique. En effet, l'équipe de Sasaoka a montré dans des myotubes L6 que SHIP2 inhibe la phosphorylation de la PKB/Akt (Sasaoka et al., 2001) et le groupe de Ijuin et al. , *via* l'utilisation d'un siRNA dirigé contre SHIP2 dans les myotubes C2C12, a mis en évidence l'implication de cette phosphatase comme inhibitrice du transport de glucose insulino-stimulé (Ijuin and Takenawa, 2012). Le rôle de SHIP2 dans l'insulinorésistance a été confirmé par plusieurs équipes dans des adipocytes *in vitro*. Ainsi, l'inhibition de SHIP2 améliore la sensibilité à l'insuline (Sasaoka et al., 2006) et la surexpression de SHIP2 régule négativement les effets métaboliques de l'insuline (Wada et al., 2001).

L'implication de SHIP2 dans l'insulinorésistance aussi été démontrée *in vivo*. L'inhibition spécifique de SHIP dans le foie de souris diabétiques KKAY améliore leur sensibilité à l'insuline (Grempler et al., 2007). De même, Hori et coll ont montré que l'expression de SHIP2 est fortement augmentée dans les muscles et les adipocytes de souris insulinorésistantes db/db (Hori et al., 2002). De plus, SHIP2 est retrouvé en abondance au niveau membranaire dans les cellules sensibles à l'insuline provenant des souris résistantes à l'action de l'hormone (Hori et al., 2002), facilitant surement l'accessibilité des PIP3 pour être déphosphorylés par SHIP2.



**Figure 5: Régulation négative de la signalisation insulinique**

Deux phosphatases, PTEN (phosphatase and tension homologue) et SHIP2 (SH2-containing inositol 5'-phosphatase-2) altèrent la voie de signalisation insulinique en déphosphorylant sur deux sites différents le Phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) produit par la PI3K.

#### b) Mécanismes insulino-indépendant

##### Exercice

Plusieurs travaux ont démontré que la stimulation du transport du glucose induite par la contraction musculaire (exercice) augmentait le contenu en GLUT4 de la membrane plasmique et des tubules-T des myofibres oxydatives et glycolytiques (Douen et al., 1989;



Hirshman et al., 1988; Roy and Marette, 1996). Depuis quelques années, des progrès considérables ont été réalisés pour clarifier les mécanismes intracellulaires par lesquels l'exercice ou la contraction musculaire activent le captage du glucose et la translocation de GLUT4 dans le muscle squelettique. Il est connu que les mécanismes régulant la contraction musculaire sont indépendants de ceux de l'insuline, puisque la contraction musculaire de muscles isolés stimule le transport du glucose en absence de l'hormone (Nesher et al., 1985; Ploug et al., 1984; Richter et al., 1985). En effet, et contrairement à l'insuline, la PI3K n'est pas impliquée dans la stimulation du transport du glucose et la translocation de GLUT4 en réponse à la contraction musculaire (Goodyear et al., 1995).

Durant l'exercice, le captage de glucose dans le muscle squelettique augmente de 40 à 50 fois par rapport au transport basal, selon l'intensité et la durée de l'exercice (James et al., 1985; Katz et al., 1986). Le captage de glucose en réponse à l'exercice comprend trois étapes importantes pour l'absorption et l'oxydation du glucose : l'apport sanguin du glucose vers le muscle, la translocation des vésicules contenant GLUT4 vers la membrane plasmique et les tubules-T en réponse aux stimuli contraction/exercice (Douen et al., 1990a; Roy and Marette, 1996; Kristiansen et al., 1996) et la phosphorylation irréversible du glucose en glucose-6-phosphate par l'hexokinase (Rose and Richter, 2005).

Brièvement, la signalisation moléculaire induite par la contraction musculaire est un phénomène complexe, et implique une grande variété de molécules comme l'AMP-activated protein kinase (AMPK), le calcium intracellulaire, ainsi que des protéines Rab, les PKC, les protéines SNARE et des composants du cytosquelette (Volchuk et al., 1994; Kristiansen et al., 1996; Thong et al., 2005; Rose et al., 2009; Ralston et al., 1994). Bien que, la régulation de l'absorption du glucose repose sur la translocation de GLUT4, elle dépend aussi du niveau d'expression du transporteur qui est augmenté en réponse à l'exercice (Richter and Hargreaves, 2013).

Récemment, en réponse à l'exercice, il a été montré une implication des protéines TBC1D1 et TBC1D4 dans la stimulation de la translocation des vésicules GLUT4 à la membrane plasmique dans le muscle des rongeurs et de l'humain (Cartee, 2015).

La libération de calcium provenant du réticulum endoplasmique est un événement central pour le processus en initiant ou facilitant l'activation de molécules de signalisation impliquées dans la stimulation du transport du glucose par la contraction musculaire. En effet, les isoformes classiques de protéine kinase C (PKC) sont activées en réponse à une augmentation de calcium et leur activation semble nécessaire à l'augmentation du transport de glucose induit par la contraction musculaire (Li et al., 2014b; Richter et al., 2001). Un autre candidat

est l'oxyde nitrique (NO). Des études ont montré qu'en inhibant la synthèse de NO en utilisant des inhibiteurs de la NO synthase (NOS), la stimulation du transport de glucose par l'exercice était inhibée (Balon and Nadler, 1997; Merry et al., 2010; Roberts et al., 1997).

Lors de la contraction musculaire, l'augmentation accrue des besoins en énergie du muscle favorise l'utilisation d'ATP. À mesure que le muscle contracte, le ratio AMP/ATP augmente, induisant l'activation de l'AMPK. L'implication de l'AMPK dans la stimulation du transport du glucose induite par la contraction musculaire a été confirmée par une étude utilisant des souris transgéniques exprimant une forme dominante négative de la sous-unité  $\alpha$ -2 de l'AMPK au niveau du muscle squelettique et cardiaque (Mu et al., 2001). En effet, chez ces souris, l'effet de la contraction musculaire *in vivo* et *in vitro* sur le captage du glucose est réduit de moitié dans les muscles EDL (Extensor digitorum longus) et soléaire (Mu et al., 2001).

En réponse à l'exercice, l'expression de GLUT4 est augmentée après hyperacétylation de l'histone localisé sur le promoteur du gène codant pour le transporteur par les facteurs de transcription HDAC4/5 (histone deacetylase) et MEF2 (myocyte enhancer factor-2) (Rose et al., 2006; Hardie, 2004; McGee, 2009). L'activation de cette voie est la conséquence d'une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire et de l'activité de l'AMPK qui activent ces facteurs de transcription (Rose et al., 2006).

### La voie CBL-TC10 dépendante

Des études ont suggéré que l'insuline pouvait aussi stimuler le transport du glucose par une autre voie de signalisation intracellulaire indépendante de la voie PI3K (Saltiel and Kahn, 2001). Cette voie implique différents acteurs comme le proto-oncogène Cbl, la CAP (Cbl associated protein), l'APS (Cbl binding protein) et la TC10 (small G protein). Ce complexe protéique réside dans les cavéoles, particulièrement abondantes dans les adipocytes et les cellules musculaires (Saltiel and Pessin, 2003).

La formation de ce complexe se déroule en plusieurs étapes. Le récepteur à l'insuline, activé par l'hormone, phosphoryle le résidu Tyr 618 d'APS, entraînant sa liaison avec Cbl et sa phosphorylation (Moodie et al., 1999). Cbl ainsi phosphorylé s'associe ensuite avec une protéine cible CAP qui se lie à la flotilline (protéine résidente des cavéoles) (Liu et al., 2003; Liu et al., 2002b), mais aussi à la protéine Crk qui se lie au facteur C3G (GDP-GTP exchange factor). Le C3G catalyse le transfert de GDP en GTP de la protéine TC10 (small G Protein, lipid raft associated), permettant l'activation de cette dernière.

Le complexe CAP/Cbl (Cbl-associated protein/proto-oncogen) et la protéine TC10 (small G protein) activés par l'insuline, contribuent ainsi à la translocation de GLUT4 et à la stimulation du transport du glucose dans les adipocytes (Baumann et al., 2000; Chiang et al., 2001; Ribon and Saltiel, 1997; Watson et al., 2001).

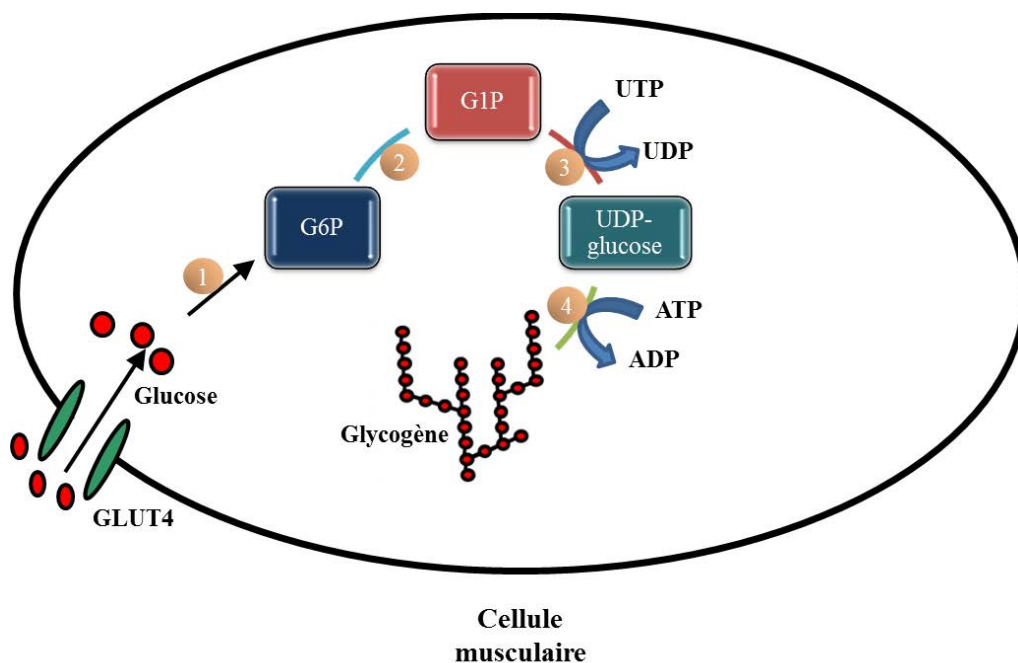
Néanmoins, l'utilisation de siRNA dirigés contre les acteurs de la voie Cbl/APS/TC10 dans les adipocytes et les cellules musculaires suggèrent que ces derniers acteurs ne sont pas nécessaire pour la stimulation de la translocation des transporteurs GLUT4 en réponse à l'insuline (JeBailey et al., 2004; Mitra et al., 2004). De plus, des souris chez lesquelles le gène codant pour Cbl a été supprimé présentent une action périphérique de l'insuline améliorée (Molero et al., 2004). Tous ces résultats semblent donc indiquer une absence d'implication de la voie Cbl/TC10 comme relayeur de la voie insulinique jusqu'aux transporteurs de glucose.

### *II.2.2 Synthèse de glycogène*

Le glycogène est un homopolysaccharide ramifié  $(C_6H_{10}O_5)_n$  de la famille des glucides constitué de nombreuses unités de D-glucose. Il constitue une réserve importante de glucose stockée dans le foie et les muscles (Roach et al., 2012).

La glycogénogenèse est la voie métabolique qui permet, dans le foie et le muscle, la synthèse de glycogène à partir du glucose pour mettre en réserve le glucose issu d'une alimentation riche en glucides. Pour la synthèse de glycogène, une molécule d'ATP est nécessaire pour incorporer une molécule de glucose dans la structure branchée du glycogène. Après un repas, les hépatocytes périportaux sont les premiers à être exposés au glucose de par leur localisation. Le transfert du glucose dans les hépatocytes est réalisé par le transporteur de glucose GLUT2. Dans la cellule, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase. La glucokinase hépatique a deux caractéristiques qui la différencient des autres hexokinases. D'une part, elle possède un  $K_m$  élevé pour le glucose (12 mM), donc une faible affinité, et d'autre part, elle n'est pas inhibée par son produit, le G6P. De ce fait, le glucose extracellulaire et intracellulaire reste en quasi équilibre même en cas d'hyperglycémie. La phosphoglucomutase va isomériser le G6P en G1P (glucose-1-phosphate), et le G1P est ensuite "activé" en UDP-glucose par l'UDP-glucose-phosphorylase en présence d'UTP. La glycogène synthase effectue des ajouts successifs d'unités UDP-glucose, par des liaisons 1-4, sur une amorce de glycogène (oligosaccharide formé de 8 unités glucose liés à une protéine, la glycogénine).

Dans le muscle, plusieurs études ont avancé que le contrôle principal de la synthèse de glycogène s'exerçait au niveau du transport et de la phosphorylation du glucose (Ren et al., 1993; Roden, 2001). En effet, dans les cellules musculaires, une hexokinase (hexokinase II) de bas  $K_m$  (0.02 mM), donc haute affinité, phosphoryle le glucose en G6P. Cette hexokinase est inhibée par son produit de réaction, le G6P. Ainsi, le glycogène reste faiblement concentré par cellule dans le muscle comparé au foie, mais compte tenu de l'importance musculaire dans l'organisme, le glycogène musculaire représente quand même deux tiers du glycogène total (figure 6).



**Figure 6: Glycogénèse musculaire**

En période post prandiale, le glucose est transporté par les GLUT4 à l'intérieur de la cellule musculaire pour être stocké sous forme de glycogène. La glycogénèse musculaire comprend 4 phases:

- 1- L'hexokinase II phosphoryle le glucose pour donner le G6P.
- 2- La phosphoglucomutase isomérisise le G6P en G1P.
- 3- Le G1P est activé en UDP-glucose par l'UDP-glucose phosphorylase.
- 4- Les unités UDP-glucose se lient à une amorce de glycogène par la glycogène synthase.

La synthèse et la dégradation du glycogène sont toutes les deux contrôlées hormonalement. Ainsi la glycogénogénèse est stimulée par l'insuline qui active une cascade de signalisation intracellulaire (voir plus haut) aboutissant à l'activation de la glycogène synthase (Sedaghat et al., 2002; Janssens and Maher, 1986). L'activité de la glycogène synthase est régulée par un système de phosphorylation/déphosphorylation par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3),

elle-même sous la régulation de la PKB/Akt (Welsh and Proud, 1993). La GSK3, constitutivement active en absence d'insuline, est une sérine/thréonine (Ser/Thr) kinase exprimée dans le cytosol, le noyau et les mitochondries de toutes les cellules eucaryotes. Il existe deux isoformes de la GSK-3 (GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ ) codées par deux gènes très homologues, gsk-3 $\alpha$  et gsk-3 $\beta$  (Woodgett, 1990). Lors de la stimulation de l'insuline, les deux isoformes de la GSK3 (GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ ) sont phosphorylées sur un résidu sérine (la sérine 21 pour la GSK3 $\alpha$  et la sérine 9 pour la GSK3 $\beta$ ) par la PKB/Akt (Sutherland et al., 1993; Cross et al., 1995), conduisant à une diminution de leur activité, levant ainsi l'inhibition sur la glycogène synthase, qui est alors déphosphorylée et activée pour induire ainsi la synthèse de glycogène.

En période de jeûne, ainsi que pendant la nuit, le foie hydrolyse le glycogène (glycogénolyse) pour reformer du glucose. Si les réserves de glycogène viennent à s'épuiser (au bout de 12 heures de jeûne chez l'homme), le foie utilise alors des protéines, du lactate (issus des muscles) ou du glycérol (issu des lipides) pour synthétiser du glucose, par la voie de la néoglucogenèse. Le glycogène est aussi utilisé par les muscles, où il est dégradé en glucose lors de l'effort musculaire. Contrairement au foie, le glucose ainsi produit par la cellule musculaire n'est pas relargué dans la circulation et ne peut donc pas être utilisé par d'autres tissus.

La glycogénolyse est stimulée par le glucagon et l'adrénaline et est assurée majoritairement par une glucosidase de type amylase ainsi que par la glycogène phosphorylase (Ortmeyer, 1997; Menendez et al., 1985; Janssens and Maher, 1986).

La fixation de chacune des hormones (glucagon ou adrénaline) sur son récepteur membranaire spécifique entraîne l'activation d'une adénylate cyclase (adénylcyclase) membranaire :

- L'adénylate cyclase activée catalyse, par hydrolyse de l'ATP, la formation de l'AMP cyclique (AMPc), considéré comme un second messager.
- L'AMPc se fixe sur une protéine kinase A (AMPc dépendante) et se combine à la sousunité régulatrice pour libérer la sous-unité catalytique (Protéine kinase A active).
- La protéine kinase A (active) phosphoryle, en présence de l'ATP, la glycogène phosphorylase kinase qui devient active sous forme phosphorylée.
- Enfin cette dernière phosphoryle la glycogène phosphorylase en la faisant passer à la forme active et catalyse par la suite, la phosphorylation du glycogène.

### ***II.2.3 Synthèse protéique***

Les protéines, dont le rôle est aussi bien structurel que métabolique, sont une composante essentielle du muscle pour assurer son remodelage permanent. La synthèse des protéines est l'acte par lequel une cellule assemble une chaîne protéique en combinant des acides aminés isolés présents dans son cytoplasme, guidé par l'information contenue dans l'ADN. Elle se déroule en deux étapes au moins : la transcription de l'ADN en ARN messager et la traduction de l'ARN messager en une protéine.

L'insuline stimule l'absorption des acides aminés dans les cellules, inhibe la dégradation des protéines et favorise leur synthèse (Saltiel and Kahn, 2001). Dans des conditions basales, l'activité constitutive de la GSK3 conduit à la phosphorylation et à l'inhibition du facteur d'échange de guanine eIF2B qui régule l'initiation de la traduction des protéines. En réponse à un signal insulinaire, l'inactivation de la GSK3 par la PKB/Akt favorise la synthèse des protéines et le stockage des acides aminés (Lizcano and Alessi, 2002). Plusieurs études soulignent le rôle crucial de mTOR comme régulateur de la synthèse des protéines (Gingras et al., 2001), mais aussi comme contrôleur de la transcription des protéines ribosomales, de la synthèse des ARN ribosomaux et des ARN de transfert (Hardwick et al., 1999; Powers and Walter, 1999). En présence des acides aminés, les deux cibles principales de mTOR sont régulées. mTOR phosphoryle et active la p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) pour initier la traduction protéique (Dennis et al., 1999), et phosphoryle et inhibe le facteur d'inhibition de la traduction (4E-BP1) (Asnaghi et al., 2004), favorisant ainsi la synthèse protéique.

### ***II.2.4 Captage et métabolisme des acides gras.***

#### ***i) Structure et classification des acides gras.***

Les acides gras sont classés en deux groupes : les acides gras saturés et les acides gras insaturés. Les acides gras saturés à chaîne courte (4 à 6 atomes de carbones comme l'acide butyrique) sont caractéristiques des acides gras qui composent le beurre. Les acides gras saturés à chaîne longue (> à 16 carbones comme l'acide palmitique et l'acide stéarique) se retrouvent dans les tissus provenant d'animaux (graisse de porc, bovin, ovin). Les acides gras saturés ne renferment pas de double liaison dans leurs chaînes carbonées.

Les acides gras mono-insaturés (acide oléique) possèdent une double liaison au niveau de leur chaîne carbonée et les acides gras polyinsaturés (linoléique et arachidonique) possèdent respectivement 3 et 4 doubles liaisons. Ces acides gras polyinsaturés sont dits essentiels ou indispensables car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation; ils se trouvent dans le lait de la femme, les huiles de maïs et de tournesol.

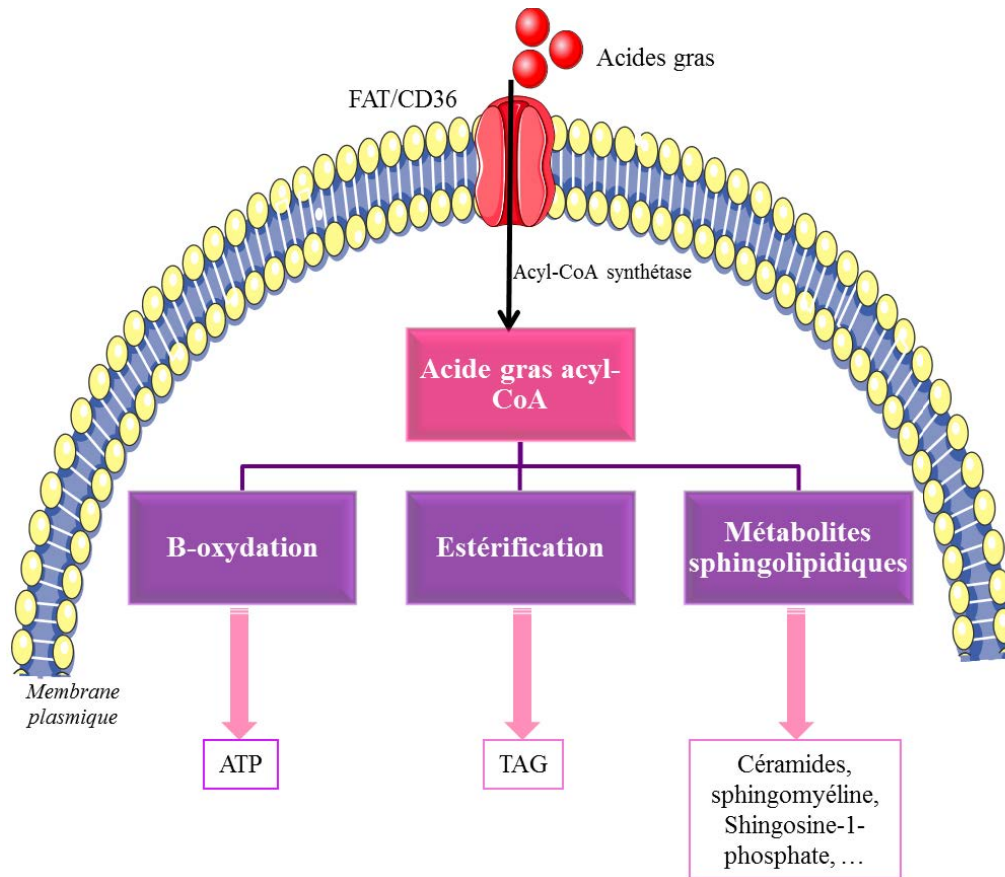
Les acides gras polyinsaturés issus de l'alimentation ne peuvent pas franchir les membranes cellulaires et doivent donc être hydrolysés au préalable dans le duodénum par des enzymes pancréatiques comme la lipase pancréatique (PNLIP) associée à la co-lipase pancréatique (CLPS) (Leger, 1984). A l'entrée de l'intestin grêle, les différents lipides hydrolysés sont intégrés dans des particules appelées micelles mixtes. Les lipides contenus dans ces vésicules sont absorbés au niveau de la bordure en brosse des cellules de la paroi interne de l'intestin grêle (entérocytes) (Hofmann and Borgstrom, 1962). Ils sont ensuite pris en charge dans un autre type de vésicule de transport, les chylomicrons qui font partie de la famille des lipoprotéines et qui contiennent du cholestérol, des triglycérides et des protéines de type apoB-48, synthétisée dans l'entérocyte, et les apoA-I, apoA-II et apoA-IV. Le passage lymphatique des chylomicrons leur permet de capter l'apo E et l'apo CII. Les lipoprotéines lipases, présentes à la surface des épithéliums vasculaires, au niveau du muscle strié squelettique, des glandes mammaires et surtout au niveau du tissu adipeux, hydrolysent les triglycérides en acides gras et glycérol.

Au passage des chylomicrons, l'apo CII (cofacteur des LPL) stimule la LPL qui hydrolyse les triglycérides en acides gras et glycérol. La régulation des LPL est tissu dépendante. Par exemple, en post prandial, l'insuline active la LPL adipocytaire pour accélérer le captage des chylomicrons au niveau du tissu adipeux. En parallèle, l'insuline inhibe l'expression de la LPL musculaire (Peinado-Onsurbe et al., 1992), cette dernière n'étant activée qu'en période de jeûne par le glucagon et l'adrénaline.

L'hydrolyse des chylomicrons, associée à un enrichissement en apo E, transforme les chylomicrons en remnants (résidus de chylomicrons) qui sont captés par le foie grâce aux récepteurs de l'Apo E et de l'apo B pour être dégradés par des lipases hépatiques.

Pour assurer la redistribution des lipides vers les autres tissus, un autre type de lipoprotéines, les VLDL (very low density lipoprotein), d'origine hépatique permettent ce transport (Karpe et al., 1995).

Une fois entrés dans les cellules *via* des transporteurs des lipides (voir plus bas), les acides gras sont activés pour être stockés en triacylglycérols dans des gouttelettes lipidiques, oxydés pour donner de l'énergie à la cellule, ou transformés en métabolites lipidiques importants pour les structures membranaire et/ou la signalisation intracellulaire (figure 7).



**Figure 7: Métabolisme des acides gras dans la cellule musculaire**

Les acides gras entrent dans la cellule *via* le transporteur FAT/CD36 et sont activés en acides gras acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase. Ils sont ensuite oxydés pour donner de l'énergie à la cellule, estérifiés en triacylglycérols et stockés dans des gouttelettes lipidiques, ou transformés en sphingolipidiques.

## *ii) Captage et activation des acides gras*

Pour produire de l'ATP, le muscle squelettique a besoin d'oxyder les acides gras, notamment les acides gras à longue chaîne. En effet, ces derniers sont le substrat majeur de ce tissu, à la fois au repos et pendant l'exercice modéré (Romijn et al., 1993). Dans le muscle au repos, il a été montré que 90% du métabolisme des lipides provient d'acides gras exogènes, et seulement 10% est dérivé des triacylglycérols endogènes (Dyck et al., 1997). Durant la contraction musculaire, l'absorption des acides gras à chaîne longue est fortement augmentée (Gorski and Bonen, 1997; Dyck et al., 1997).

Selon la longueur de leur chaîne, les acides gras entrent dans les cellules musculaires par diffusion passive (chaîne courte  $C < 8$  et moyenne  $C > 8$  et  $C < 12$ ) ou par l'intermédiaire d'une protéine de transport (chaînes longues  $C > 12$  et  $C < 20$ , chaînes très longues  $C > 20$ ).



Les transporteurs des acides gras à chaînes longues sont des translocases des acides gras (FAT/CD36) et des protéines liant les acides gras associées à la membrane plasmique (FABP1 et 4) (Holloway et al., 2008; Storch and Thumser, 2010).

L'expression de FAT/CD36 est importante dans les tissus ayant une capacité métabolique élevée pour les acides gras comme le tissu adipeux, le cœur et les muscles squelettiques (Abumrad et al., 1993). Dans les cellules musculaires, l'expression de FAT/CD36 est plus abondante dans les fibres de type I, et est encore augmentée lors d'une stimulation musculaire lors de la contraction, concomitante à une augmentation du transport des acides gras à l'intérieur des cellules (Jeppesen et al., 2011).

Les acides gras à chaîne très longue sont transportés par des transporteurs spécifiques, FATP1 et FATP4 (Gimeno, 2007; Glatz et al., 2010). FATP1 et FATP4 sont exprimés de façon importante dans le cerveau (Fitscher et al., 1998). FATP4, toujours localisé au niveau du RE, est seul FATP, est exprimé au niveau de l'intestin grêle et est ainsi responsable de l'absorption des lipides nutritionnels à chaîne très longue (Milger et al., 2006). FATP1 est un transporteur insulino-sensible, et est exprimé majoritairement au niveau de la membrane plasmique dans les adipocytes et les muscles squelettiques. Il a été montré comme étant impliqué dans l'obésité induite par le régime riche en graisse, puisque des souris FATP1 KO ne stockent plus les lipides au niveau des adipocytes et des cellules musculaires et ces souris sont protégées de l'insulinorésistance induite par le régime gras. (Lobo and Bernlohr, 2007; Wu et al., 2006).

Parallèlement à leur expression au niveau de la membrane plasmique, les transporteurs FAT/CD36 et FATP1 sont aussi exprimés au niveau mitochondrial dans les muscles de rat et humains, permettant ainsi d'augmenter la capacité des mitochondries à oxyder les acides gras à chaînes longues et à produire plus d'énergie durant l'exercice physique (Benton et al., 2008; Bezaire et al., 2006; Holloway et al., 2009; Benton et al., 2004; Campbell et al., 2004; Sebastian et al., 2009).

Une fois dans la cellule, les acides gras qui sont insolubles se lient à deux types de transporteurs comme la fatty acid binding protein cytoplasmique (FABPc) ou des protéines liant l'acyl-CoA (Acyl-CoA Protein Binding, ACBP).

### *iii) Activation des acides gras dans le cytosol*

Pour être métabolisés, les acides gras sont activés en acyl-CoA *via* les acyl-CoA synthétase (Watt and Hoy, 2012). Les acyl-CoA synthétases sont des enzymes liées à la membrane plasmique, classées en quatre groupes selon la taille des acides gras qu'elles utilisent.

Différents isoformes d'acyl-CoA synthétase catalysent le couplage des acides gras avec le coenzyme A (en utilisant de l'ATP), processus nécessaire pour envoyer les acides gras vers la mitochondrie pour y être oxydé ou vers la biosynthèse de lipides neutres et membranaires. Ce sont les isoformes d'acyl-CoA synthétases 1, 4 et 6 qui sont exprimés dans les cellules musculaires (Mashek et al., 2006). Cependant, les FATP1 et 4 possèdent eux aussi une activité acyl-CoA synthétase dont les cibles sont les acides gras à longue et très longue chaîne (Watt and Hoy, 2012). Des études génétiques ont montré que ces deux enzymes modulent l'activité de l'acyl-CoA synthétase dans le muscle (Digel et al., 2011; Kim et al., 2004).

#### *iv) Régulation de la $\beta$ -oxydation mitochondriale*

Au repos, environ 25% des acides gras entrés dans la cellule sont oxydés (Dyck and Bonen, 1998). Ce pourcentage est augmenté dans des situations de jeûne (Bessesen et al., 2000), et lors de la contraction musculaire (Dyck and Bonen, 1998).

A l'opposé, l'insuline diminue l'oxydation des acides gras en inhibant leur entrée dans la mitochondrie (voir plus bas).

Les facteurs limitant l'oxydation sont multiples: un excès d'acides gras, la nature des acides gras (les saturés sont moins oxydés que les insaturés) (Lambert and Parks, 2012), la nature des fibres musculaires (oxydatives ou glycolytiques), la longueur de la chaîne des acides gras (Holloway et al., 2008) et le besoin énergétique des muscles.

L'oxydation des acides gras s'opère à l'intérieur des mitochondries qui sont les centres de production d'énergie dans les cellules. Dans un premier temps, il y a conversion des acyl-CoA à longue chaîne en acylcarnitine par l'ajout d'un résidu carnitine au groupe acyl *via* la Carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1). Les cellules de mammifères expriment trois isoformes de CPT1. L'isoforme hépatique (CPT1A), l'isoforme musculaire (CPT1B), et un troisième isoforme de CPT1 (CPT1C), principalement exprimé dans le cerveau et les testicules (Schreurs et al., 2010). La CPT1 est localisée au niveau de la surface externe de la membrane mitochondriale, et joue un rôle majeur dans la régulation de l'absorption des acides gras (Lopaschuk et al., 2010). Elle catalyse l'étape d'engagement de l'acide gras dans le métabolisme énergétique : c'est donc une enzyme-clé de la  $\beta$  oxydation.

Ensuite, un transporteur appelé acylcarnitine translocase (CAT) transporte les acylcarnitines de la membrane externe vers la membrane interne de la membrane de la mitochondrie.

Une fois que les acide gras sont à l'intérieur de la mitochondrie, et afin d'être métabolisés pour produire de l'énergie, la carnitine palmitoyltransférase (CPT2) localisée dans la

membrane interne de la mitochondrie, re-convertis l'acyl-carnitine en acyl-CoA qui rejoint alors la  $\beta$ -oxydation dans la matrice mitochondriale.

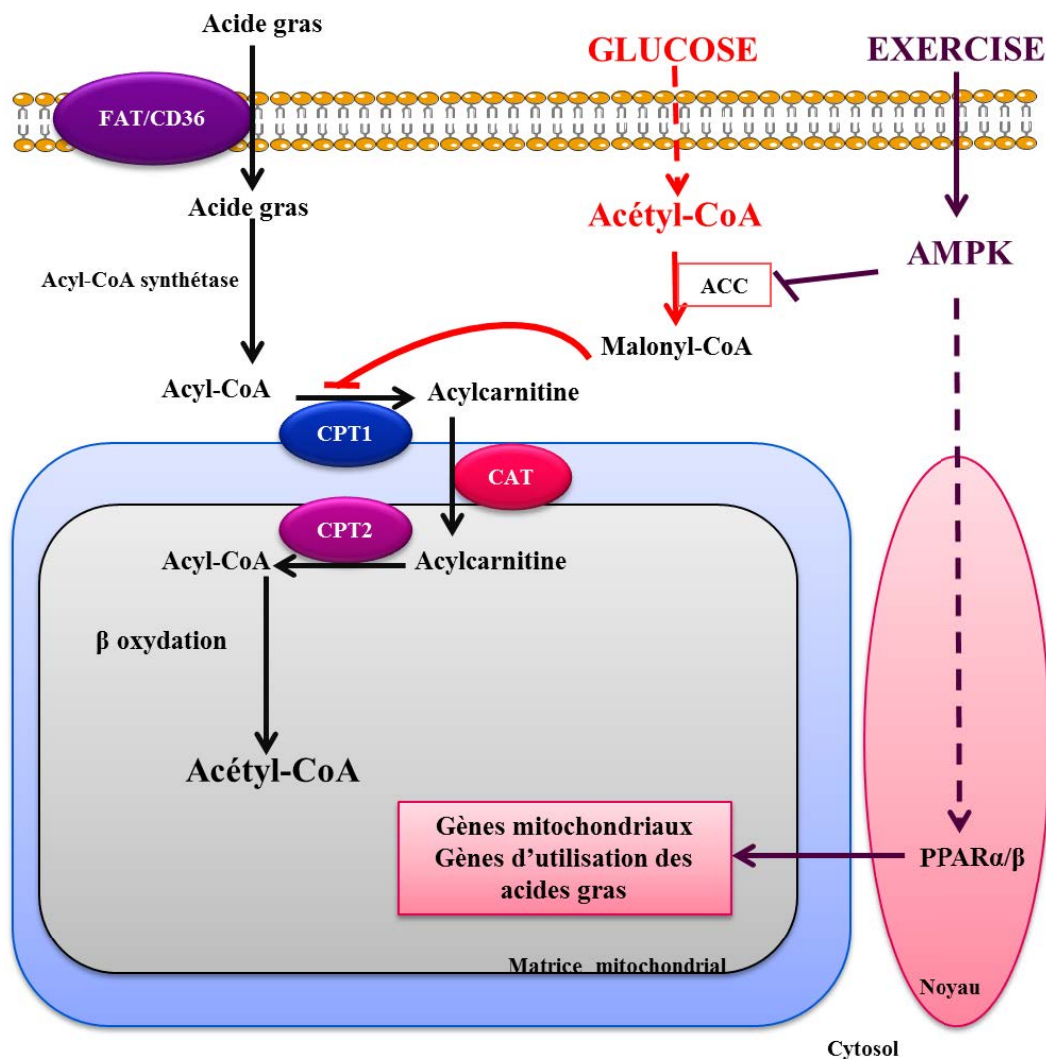
En période d'hyperglycémie, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) catalyse l'activation de l'acétyl-CoA produit par la glycolyse en malonyl-CoA, intermédiaire métabolique de la synthèse des acides gras. Des études ont montré que les concentrations de malonyl-CoA sont inversement corrélées avec la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Lopaschuk et al., 2010). En fait, le malonyl-CoA se lie allostériquement à la CPT-1, inhibant ainsi son activité et ainsi le transfert des acides gras dans la mitochondrie (McGarry, 2001). Dans les tissus tels que le tissu adipeux et le foie, le malonyl-CoA est le premier intermédiaire de la synthèse des acides gras à longue chaîne. Le malonyl-CoA a aussi été détecté dans les muscles squelettiques, et bien que son niveau d'expression soit bien inférieur à celui retrouvé dans les tissus lipogéniques (adipeux et foie), il a été montré que la CPT1 est beaucoup plus sensible au malonyl-CoA dans les muscles squelettiques que dans le foie (Dyck et al., 2001; Lloyd et al., 1986). Il semble donc le malonyl-CoA joue un rôle très important dans la régulation de l'oxydation des acides gras dans le muscle.

Chez les mammifères, deux isoformes d'ACC sont exprimés, l'ACC1 et l'ACC2 qui diffèrent de par leur distribution tissulaire et leur fonction. L'ACC1 se trouve dans le cytoplasme de toutes les cellules mais est exprimée fortement dans les tissus lipogéniques où la synthèse des acides gras est importante (Kim and Freake, 1996). Dans les tissus oxydatifs, comme les muscles squelettiques et le cœur, l'expression de l'ACC2 est plus importante. Dans le foie, où aussi bien la synthèse que l'oxydation des acides gras est importante, les deux isoformes sont exprimés à des niveaux similaires (Nakamuta et al., 2005). Les différences de distribution tissulaire indiquent que l'ACC1 régule de la synthèse des acides gras alors que l'ACC2 régule l'oxydation des acides gras (Schreurs et al., 2010).

L'expression des isoformes de la CPT s'opère aussi à un niveau transcriptionnel *via* les facteurs de transcription PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta$  (peroxisomal proliferator-activated receptor alpha et beta). En réponse à des ligands hydrophobes comme les acides gras et leurs dérivés, les récepteurs nucléaires, PPAR s'hétérodimérisent avec le RXR (retinoïde X receptor) et se lient à des régions spécifiques de l'ADN des gènes cibles pour initier ou inhiber leur transcription (P. Lefebvre, 2006).

Le facteur PPAR $\beta$  est ubiquitaire et est le plus abondant parmi la famille des PPAR dans le muscle squelettique (Ehrenborg & Krook, 2009; Staiger et al., 2009). L'expression de PPAR $\beta$  est plus importante dans les fibres musculaires oxydatives de type I que dans les fibres glycolytiques de type II (Wang et al., 2004) et pourrait partiellement relayer les adaptations

positives du muscle squelettique durant l'exercice physique (Fritz et al., 2006; Luquet et al., 2003). L'activation de PPAR $\beta$  par des ligands hydrophobes diminue l'hyperglycémie, l'insulinorésistance et la dyslipidémie chez les animaux (Leibowitz et al., 2000; Oliver Jr et al., 2001; Tanaka et al., 2003; Wang et al., 2004) et chez l'homme (Bays et al., 2011; Riserus et al., 2008). Cependant, d'autres études montrent une réduction du transport de glucose dans le muscle squelettique via l'activation du PPAR $\beta$  (Brunmair et al., 2006; Cresser et al., 2010). Le facteur PPAR $\alpha$  est exprimé dans les tissus périphériques ayant un métabolisme lipidique élevés comme le foie et le muscle squelettique, et son activation stimule l'oxydation des acides gras et diminue les concentrations circulantes des triglycérides (S. Mandard 2004 ; N. Takahashi, 2009). Durant l'exercice, et comme PPAR $\beta$ , PPAR $\alpha$  avec son corégulateur PGC1 $\alpha$  (peroxisomal proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ ), stimulent l'expression des gènes de transport des acides gras comme FATP et FAT/CD36, ainsi que le gène de la CPT1 (Napal et al., 2003; Moore et al., 2003) (figure 8). Ainsi, les agonistes synthétiques de PPAR $\alpha$  comme les fibrates ont des effets hypolipidémiques chez l'humain et les rongeurs (K. Schoonjans 1996).



**Figure 8: Régulation de la  $\beta$  oxydation**

La CPT1 et la CPT2 facilitent l'entrée de l'acyl-CoA sous forme d'acylcarnitine entre les 2 membranes mitochondriales. Une fois dedans, l'acyl-CoA est oxydé en acétyl-CoA.

- Le glucose *via* son métabolite l'acétyl-CoA, régule négativement la  $\beta$  oxydation en produisant du malonyl CoA, qui se lie allostériquement à la CPT1 en bloquant par la suite son activité.
- L'exercice *via* l'AMPK stimule la  $\beta$  oxydation, en inhibant la formation du malonyl CoA (*via* l'inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase, ACC) d'un côté, et en stimulant la transcription des gènes mitochondriaux d'un autre côté.

La  $\beta$ -oxydation des acides gras insaturés pose un problème particulier dû à la présence éventuelle d'une ou de plusieurs doubles liaisons mal positionnées empêchant la formation d'une double liaison *trans*- $\Delta^2$  par l'acyl-CoA déshydrogénase. Ainsi, la dégradation des acides gras insaturés nécessitent deux enzymes supplémentaires: une réductase (2,4-diénoyl-

coenzyme A réductase), et une isomérase (Dodécénoyl-coenzyme A isomérase) (Hiltunen et al., 1986; Partanen et al., 2004).

La dégradation complète de l'acide gras se poursuit jusqu'à ce que la chaîne carbonée soit complètement découpée en molécules d'acétyl-CoA : c'est un processus qu'on appelle hélice de Lynen. Chaque tour d'hélice raccourcit l'acyl-CoA de deux atomes de carbone et libère une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de FADH<sub>2</sub> et une molécule de NADH. Cette dégradation intervient par des oxydations sur les carbones  $\beta$  successifs, d'où le terme  $\beta$ -oxydation.

#### **v) *Estérification des acides gras***

Les acides gras activés et non oxydés, sont transportés majoritairement dans le réticulum endoplasmique (RE) afin d'y être estérifiés en triacylglycérols (TAG). Les TAG synthétisés sont stockés dans des gouttelettes lipidiques localisées proche du RE et des mitochondries (Shaw et al., 2008). En cas de stimulation musculaire, les TAG intramusculaires sont hydrolysés pour redonner des acides gras qui seront ensuite oxydés. Il est intéressant de noter que l'énergie d'un muscle comme le muscle soléaire du rat en période d'exercice vient majoritairement de l'hydrolyse des TAG intramusculaires (75%) (Dyck and Bonen, 1998).

#### **vi) *Voie de synthèse des triacylglycérols***

La biosynthèse des triacylglycérols (TAG) débute dans le RE par l'acylation séquentielle du glycérol-3-phosphate par un acide gras acyl-CoA. L'étape est catalysée par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) pour former l'acide lysophosphatidique (LPA).

Le LPA est ensuite acylé à nouveau par la 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) pour produire de l'acide phosphatidique (PA). Il est important de noter que la GPAT et la AGPAT possèdent deux isoformes, l'un étant mitochondrial et l'autre microsomal. Dans les deux cas, les deux premières réactions conduisent à la production de PA, que ce soit dans le RE ou au niveau de la mitochondrie (Coleman and Mashek, 2011).

Le PA est ensuite transformé en diacylglycérol via l'acide phosphatidique phosphatase (PAP, aussi appelée lipine).

Enfin, la dernière estérification s'effectue via l'acyltransférase DAG (DGAT) pour produire un TAG. Il existe deux isoformes de DGAT : la DGAT1 qui est exprimée dans le muscle squelettique, les glandes mammaires et le tissu adipeux, et la DGAT2 qui est exprimée dans le foie, le tissu adipeux et le cœur (Coleman and Mashek, 2011).

Les TAG ainsi synthétisés sont ensuite stockés dans des gouttelettes lipidiques afin d'être utilisé comme réserve énergétique dans des situations de jeûne ou d'exercice.

### *vii) Synthèse des sphingolipides*

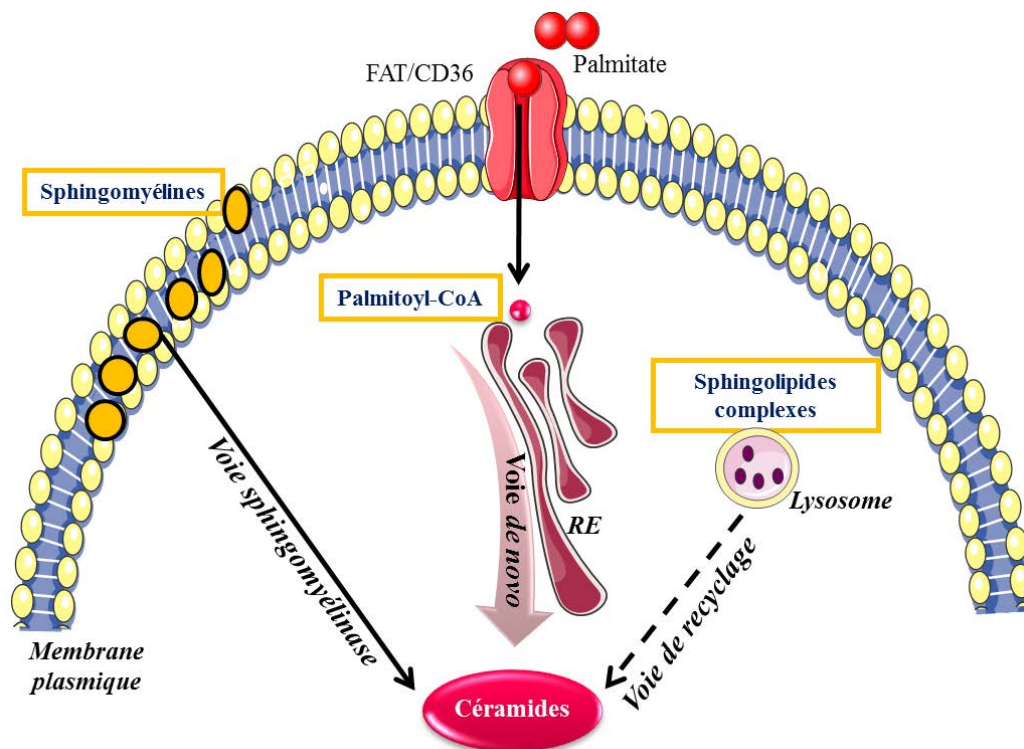
Les sphingolipides sont des molécules ubiquitaires indispensables pour le maintien et le développement des organismes vivants. Ils ne sont pas répartis uniformément dans les membranes mais regroupés sous forme de microdomaines lipidiques appelés radeaux lipidiques ou rafts. On a longtemps pensé que les sphingolipides avaient uniquement un rôle structural. On sait maintenant qu'ils jouent aussi un rôle de récepteur et de seconds messagers (intervenant dans des fonctions majeures de la vie cellulaire) et que de nombreuses maladies génétiques (sphingolipidoses) s'expliquent par un dysfonctionnement de leur métabolisme. La voie de biosynthèse des sphingolipides à partir des AG est constituée à partir d'un réseau complexe de réactions de synthèse et de dégradation. Les céramides sont des intermédiaires sphingolipidiques clefs servant de squelette pour la production de nombreux autres produits sphingolipidiques comme les glucosylcéramides, le céramide-1-phosphate, la sphingosine-1-phosphate et les sphingomyélines (Kitatani et al., 2008; Wenekes et al., 2009).

Des études ont placés les sphingolipides, et plus particulièrement les céramides, la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate, au centre de nombreux processus biologiques en montrant, en plus de leur rôle structural, leur participation à la transduction de signaux en réponse à différents stimuli liés au stress, à la formation et à la régulation de radeaux lipidiques membranaires et à l'induction de l'apoptose, la différenciation et la régulation de la croissance cellulaire (Perry and Hannun, 1998).

Les sphingolipides tiennent leur nom du sphinx de la mythologie grecque. Ce sont des composés amphiphiles avec une queue hydrophobe et une tête polaire hydrophile, directement responsables de leurs propriétés. Les sphingolipides ont une grande diversité de structure et de fonction, mais dérivent tous d'une base sphingoïde, un amino-alcool insaturé de 18 carbones. Chez les vertébrés, la base sphingoïde est majoritairement la sphingosine ou la sphinganine (dihydrosphingosine), tandis que chez les plantes on trouve des composés plus variés, avec une base sphingoïde à 20 carbones (Desai et al., 2002). La connaissance du métabolisme des sphingolipides a progressé grâce à l'identification des différentes enzymes impliquées dans leur biosynthèse (Hannun and Luberto, 2004; Huitema et al., 2004; Marchesini and Hannun, 2004).

Les sphingolipides sont formés suivant trois voies distinctes (figure 9):

- **voie de synthèse *de novo*** initiée par la condensation de la sérine et du palmitoyl-CoA et conduisant, par une cascade de réactions enzymatiques, à la formation de céramides dans le RE.
- **Voie de recyclage ou de sauvetage** dans les lysosomes qui utilise les sphingolipides complexes (sphingomyélines, glycosphingolipides) pour donner de la sphingosine, ensuite réacylée pour former des céramides.
- **Voie « sphingomyélinase »** où les sphingomyélines (SM) sont hydrolysées par des sphingomyélinases dans les membranes cellulaires pour libérer des céramides.



**Figure 9: Voies de synthèse des céramides**

Les céramides peuvent être produits par 3 voies différentes:

- 1) Voie de synthèse *de novo* des céramides qui s'effectue au niveau du RE, à partir du palmitoyl-CoA
- 2) Voie de recyclage où les sphingolipides complexes comme les sphingomyélines et les glycosphingolipides sont dégradés dans le lysosome pour donner la sphingosine. Celle-ci est ensuite réacylée pour donner les céramides.
- 3) Voie sphingomyélinase où la sphingomyélinase convertit les sphingomyélines membranaires en céramides.



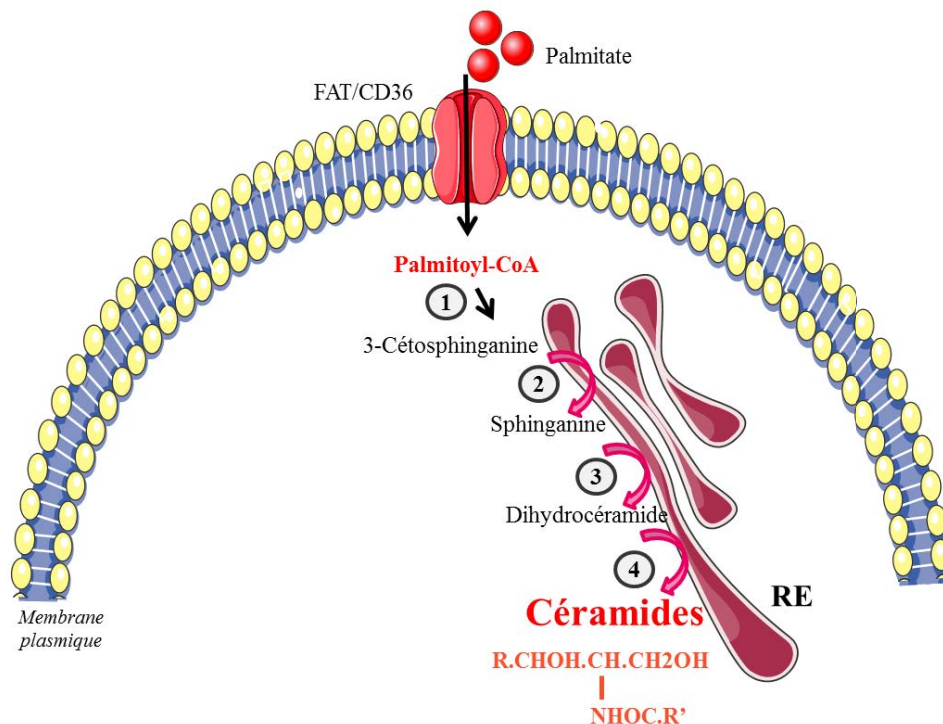
a) Voie *de novo*

Dans des conditions de pléthore lipidique, la voie *de novo* semble être la voie majoritaire pour la synthèse des céramides. La première étape de la voie *de novo* s'effectue au niveau du RE (Futerman and Riezman, 2005; Futerman, 2006) et est catalysée par la Sérine-Palmitoyl-Transférase (SPT), décrite comme un hétérotrimère composé des sous-unités LCB1, LCB2 et LCB3 (Long chain bases 1, 2 et 3). L'association de LCB3 avec l'une des deux autres sous-unités produit préférentiellement une base sphingoïde en C16 à partir de myristate en quantité minoritaire (Hornemann *et al.* 2009), alors que le complexe formé à partir de LCB1 et LCB2 produit une base sphingoïde en C18. La SPT appartient à la famille des oxoamine-synthases qui utilise le pyridoxal-phosphate comme cofacteur (Hanada, 2003). La SPT est ubiquitaire et son activité a été détectée dans tous les tissus, notamment dans le cerveau, les poumons, le foie, les reins, et les muscles (Merrill, Jr. et al., 1985). L'absence d'une sous-unité est létale au stade embryonnaire tandis que les individus hétérozygotes pour les mutations de ces sous-unités ont des niveaux d'expression de sphingolipides plasmatiques et cellulaires très affectés (Merrill, Jr., 2002; Hojjati et al., 2005).

La 3-cétosphinganine formée par la SPT à partir de la L-sérine et du palmitoyl-coA, est ensuite réduite par une cétosphinganine réductase pour former la sphinganine ou la dihydrosphingosine.

La troisième étape consiste à l'attachement d'un acide gras pour générer le dihydrocéramide par une céramide synthase (CerS). Chez les mammifères, six isoformes de CerS sont exprimés et sont nommés CerS1 à CerS6. Ils catalysent la même réaction chimique, mais ont des spécificités pour la longueur de la chaîne d'acyl-CoA rajoutée par N-acylation (Mullen et al., 2012). Les isoformes de CerS sont responsables de la composition de céramides en acide gras. D'une manière intéressante, les fonctions cellulaires de céramides sont basées sur la longueur de leurs chaînes acyl-CoA (Hartmann et al., 2012; Hannun and Obeid, 2011)

La dernière réaction est catalysée par une dihydrocéramide désaturase pour donner des céramides (figure 10).



**Figure 10: Voie de biosynthèse *de novo* des céramides**

Les acides gras saturés (palmitate) sont activés acyl-CoA dans le cytoplasme et transformés en céramides par la voie de biosynthèse *de novo* qui se tient dans le réticulum endoplasmique (RE). Cette dernière se déroule en plusieurs étapes clefs:

- 1) Le palmitoyl-CoA se condense à la L-sérine pour donner la 3-céto-sphinganine (étape catalysée par la sérine palmitoyl transférase).
- 2) La 3-céto-sphinganine réductase réduit la 3-céto-sphinganine en sphinganine.
- 3) La sphinganine est acétylée par les céramides synthase pour donner des dihydrocéramides.
- 4) La dihydrocéramide désaturase convertit les dihydrocéramides en céramides.

Les céramides et leurs dérivés sphingolipidiques jouent un rôle majeur comme seconds messagers lipidiques, en particulier dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Spiegel and Merrill, Jr., 1996). Cependant, les réponses cellulaires induites par les céramides dépendent grandement de leur localisation subcellulaire. Parce que les céramides sont synthétisés majoritairement *de novo* dans le RE et sont convertis en sphingomyélines (SM) et en glucosylcéramides (GlcCer) au niveau de l'appareil de Golgi (Hanada et al., 2003) le transport intracellulaire des céramides du RE vers le Golgi implique l'existence de transporteurs spécifiques impliquant à la fois des mécanismes indépendants et dépendants de l'ATP. Les céramides arrivés sur la face cis du Golgi produiront des glucosylcéramides (GLCcer) *via* la glucosylcéramide synthase (Ichikawa and Hirabayashi, 1998), alors que les céramides

transportés vers la face trans du Golgi seront ensuite transformées en sphingomyéline *via* la sphingomyéline synthase 1 (SMS1) (Yamaoka et al., 2004). Il faut noter qu'il existe deux isoformes de SMS, SMS1 qui est localisé dans le Golgi (Yamaoka et al., 2004), et SMS2 localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules (Tafesse et al., 2007).

- **Transport vésiculaire**

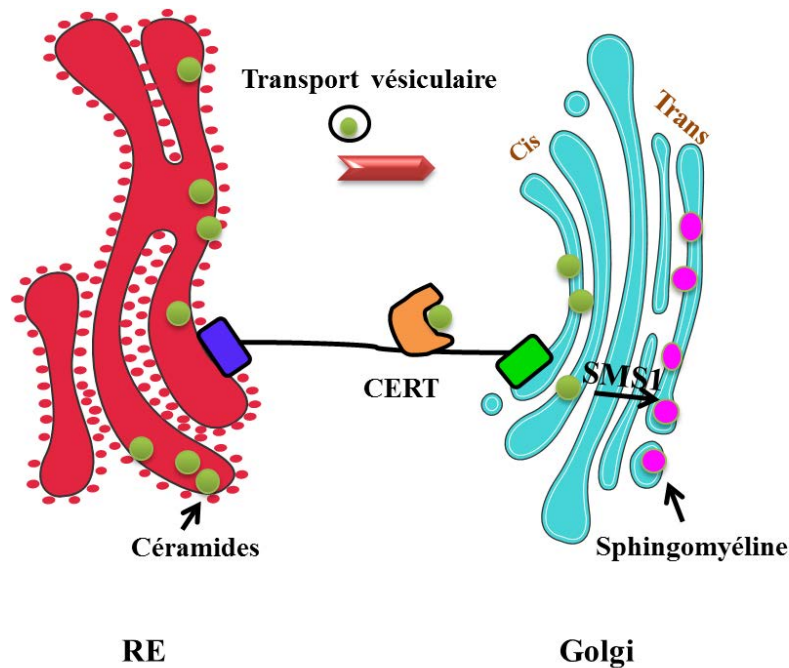
Les céramides destinés à être métabolisés en glucosylcéramides au niveau de la face cis de l'appareil de Golgi (situé en aval du RE), sont transportés *via* un transporteur vésiculaire ATP indépendant (Futerman and Pagano, 1991; Jeckel et al., 1992) (figure 11).

Les vésicules de transport sont créées à la surface du RE *via* un assemblage protéique qui a pour rôle d'induire la courbure de la membrane du RE, de concentrer la charge lipidique ou protéique dans la vésicule naissante et de détacher la vésicule de la membrane cytoplasmique. Cet assemblage qui s'appelle COPII coat est formé de 5 protéines: Sar1, Sec13, Sec23, Sec24 et Sec31 (Barlowe et al., 1994; Barlowe, 2002; Matsuoka et al., 1998; Miller et al., 2003; Mossessova et al., 2003).

Ce transporteur assure principalement le transport des céramides à longue chaîne (> C20) et n'a pas été bien caractérisé. Plusieurs études ont montré l'implication de protéines kinases dans la régulation de ce transport (Aridor and Balch, 2000; Lee and Linstedt, 2000). Le groupe de Guissani a montré que l'activité de ce transporteur est régulée positivement par la voie PI3K dans les cellules gliales C6 (Giussani et al., 2008). En effet, l'inhibition de la PI3K, constutivement active dans ce type cellulaire par l'intermédiaire de la Wortmannine ou le LY-294002, inhibe le transport vésiculaire des céramides et la concentration de glucosylcéramides synthétisés dans l'appareil de Golgi (Giussani et al., 2008).

- **Transport non-vésiculaire**

Le transport des céramides vers la face trans de l'appareil de Golgi (tourné vers le cytoplasme), pour y être transformé en sphingomyélines est effectué par un transporteur non-vésiculaire appelé CERT (CERamide Transporteur) (figure 11).



**Figure 11: Différents types de transport des céramides**

Les céramides sont transportés du RE au golgi *via* 2 types de transporteurs:

- ❖ Un transporteur vésiculaire assurant le transport des céramides à chaîne carbonnée très longue (>20) vers la face cis du golgi pour donner des glucosylcéramides.
- ❖ Un transporteur protéique « CERT » assurant le transport des céramides -C14,-C16,-C18, et -C20 vers la face trans du golgi pour être transformés en sphingomyéline.

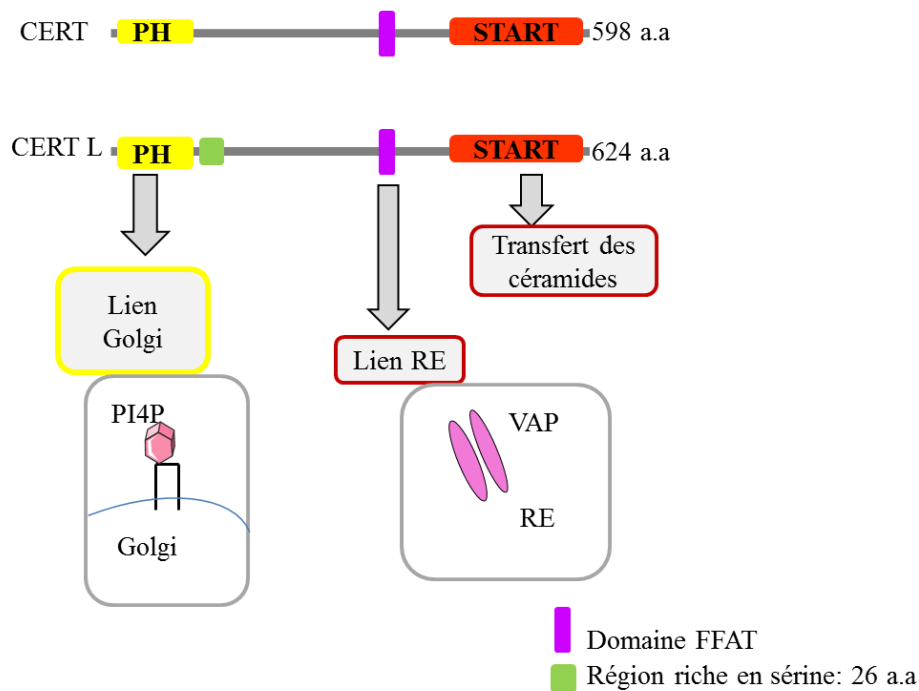
CERT est une protéine hydrophile, composée de 3 parties distinctes : Une région N-terminale de 120 acides aminés (aa) comprenant un domaine PH (Raya et al., 1999; Raya et al., 2000), une région C-terminale START (carboxy (C)-terminal steroidogenic acute regulatory (StAR)-related lipid transfer) de 230 aa (Ponting and Aravind, 1999), les deux connectés par une région centrale de 250 aa contenant un motif FFAT (two phenylalanines in an acidic tract) et un motif riche en sérine (décrit plus bas).

CERT est exprimée sous 2 isoformes : une forme longue CERT<sub>L</sub> de 72 kDa (GPBDP, Goodpasture antigen-binding protein) et une forme épissée GPBPΔ26 de 68 kDa (tronquée du motif riche en sérine) (figure 12). Les 2 isoformes ont une activité de transport des céramides observée *in vitro* et *in vivo* (Fukasawa et al., 1999) et sont exprimés majoritairement dans les muscles striés, le cerveau et minoritairement au niveau du placenta, les poumons et le foie (Raya et al., 1999). De plus, la forme courte GPBPΔ26 est beaucoup plus exprimée que la forme longue CERT<sub>L</sub> dans le rein, le pancréas et dans des lignées de cellules cancéreuses (Raya et al., 1999).

**Le domaine PH** se lie spécifiquement au phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) présent principalement au niveau de la face trans du Golgi (Levine and Munro, 2002; Godi et al., 2004; Hanada et al., 2007a).

**Le domaine START** se lie stéréospécifiquement avec un rapport 1 :1 aux céramides -C14, -C16, -C18 et -C20, mais ne transporte pas les céramides à plus longue chaîne, ni la sphingosine, ni la sphingomyéline (Kumagai et al., 2005; Hanada et al., 2007a). CERT peut aussi catalyser le transport inter-membranaire d'autres isoformes de céramides comme les C16-hydrocéramides, et les C16-phytocéramides, mais aussi le cholestérol et la phosphatidylcholine.

**Le domaine FFAT** de CERT est un petit motif peptidique dont la séquence conservée est EFFDaxE et qui interagit avec la protéine membranaire résidente du RE appelée VAP. VAP co-immunoprécipite avec CERT et la mutation de son domaine de liaison avec CERT inhibe le transport des céramides du RE vers le Golgi (Kawano et al., 2006; Hanada et al., 2009). Le domaine START liant les céramides, le domaine PH se liant au Golgi et le motif FFAT interagissant avec le RE, sont tous indispensables pour un transport efficace de céramides du RE vers le Golgi (Kawano et al., 2006).



**Figure 12: Isoformes du transporteur CERT**

Il existe 2 isoformes du transporteur CERT:

- ❖ CERT L: formé de 642 a.a., contient un domaine PH, un domaine START, un domaine riche en FFAT et une région riche en sérine.
- ❖ CERT court: formé de 598 a.a., tronqué de la région riche en sérine.

Le domaine PH sert à la liaison de CERT avec les PI4P de la membrane du golgi.

Le domaine START transporte les céramides du RE vers le golgi

Le domaine FFAT de CERT se lie aux protéines VAP du RE.

### • Régulation de CERT

**La régulation de l'activité** de CERT a été décrite par le groupe d'Hanada qui a montré que l'hyperphosphorylation du résidu sérine 132 (S132) du motif riche en sérine de CERT dans certaines conditions de stress par la protéine kinase D (PKD) inhibe l'activité de CERT en réduisant son affinité pour le PI4P localisé au niveau du Golgi (Kumagai et al., 2007). Ce groupe a aussi montré que la substitution de la Sérine 132 de CERT par une Alanine (S132A) empêche l'hyperphosphorylation de CERT et parallèlement améliore le transport des céramides du RE vers le Golgi (Kumagai et al., 2007).

La PKD contient deux domaines riches en cystéines qui lient les DAG, un domaine PH qui remplit une fonction auto-inhibitrice, ainsi qu'un domaine kinasique. La PKD est activée, entre autre, par phosphorylation de son résidu Sérine 960 en réponse à différents stress (Franz-Wachtel et al., 2012). Cette kinase régule divers processus cellulaires tels que la prolifération et la survie cellulaire, le trafic vésiculaire, et certaines réponses cellulaires

immunitaires (Wakana et al., 2012). Un certain nombre de substrats de la PKD ont été identifiés, comme la protéine neuronale Kidins220 (Iglesias et al., 2000), l'effecteur Rin1 (Wang et al., 2002), les désacétylases de classe II HDAC 5 (Vega et al., 2004) et 7 (Dequiedt et al., 2005), la kinase PI4KIII $\beta$  (Hausser et al., 2005), et CERT (Hanada et al., 2009).

L'action de la PKD sur CERT est double et dépend des quantités de céramides synthétisées *de novo* au niveau du RE. D'un côté, les DAG produits lors de la conversion des céramides en sphingomyéline activent la PKD qui stimule la synthèse de PI4P au niveau du Golgi *via* l'activation de la kinase PI4KIII $\beta$ , contribuant au recrutement de CERT vers le Golgi.

A l'opposé, quand trop de céramides sont transportés dans le Golgi et quand trop de sphingomyélines sont produites, la PKD phosphoryle directement CERT et régule négativement son activité de transport du RE vers le Golgi, empêchant ainsi les céramides de s'accumuler dans le Golgi (Fugmann et al., 2007a; Nhek et al., 2010).

Il est important de noter que CERT peut aussi être régulé au niveau de son expression. En effet, une étude récente a montré qu'un stress pro-apoptotique induit par le TNF $\alpha$  pouvait induire un désassemblage du Golgi et le clivage de CERT par différentes caspases (2, 3 et 9), conduisant ainsi à une réduction du trafic des céramides du RE vers le Golgi (Chandran and Machamer, 2012a).

#### b) Voie de recyclage

La voie de recyclage des bases sphingoïdes à longues chaînes menant vers la régénération des sphingolipides, constitue entre 50% et 90% de la biosynthèse des sphingolipides (Gillard et al., 1998; Tettamanti et al., 2003). Ceci suggère un rôle crucial de cette voie dans la biosynthèse/recyclage des sphingolipides, et une implication importante dans la signalisation cellulaire.

La dégradation constitutive des sphingolipides complexes et des glycosphingolipides (Riboni et al., 1997; Kolter and Sandhoff, 2005) prend place dans des compartiments subcellulaires acides que sont les endosomes et les lysosomes (figure 10). Dans le cas des glycosphingolipides, des exohydrolases (acide  $\beta$ -glucosidase) libèrent les unités de monosaccharides pour générer des céramides. De même, les sphingomyélines se trouvant dans les lysosomes sont reconvertis en céramides *via* des Sphingomyélinases acides (aSMase) (Riboni et al., 1994). Le produit métabolique commun de ces dégradations (les céramides) peut ensuite être hydrolysé par des céramidases acides pour donner de la sphingosine et des acides gras libres capables (au contraire des céramides) de sortir des lysosomes (Riboni et al., 1998; Chatelut et al., 1998).

La sphingosine et les acides gras libres libérés du lysosome peuvent ensuite entrer dans la voie de biosynthèse des céramides et/ou de la S1P (sphingosine-1-phosphate) pour y être métabolisé (Olivera and Spiegel, 2001; Baumruker et al., 2005). En effet, la voie de recyclage réutilise la sphingosine formée pour générer des céramides *via* les céramides synthases (CerS) (Smith and Merrill, Jr., 1995).

### c) Voie des sphingomyélinases

La sphingomyéline est le sphingolipide complexe le plus abondant dans les cellules (chez l'homme, la sphingomyéline représente 85% de tous les sphingolipides). Par conséquent, le métabolisme coordonné de ce lipide est essentiel pour le maintien de l'homéostasie membranaire. La dégradation de la sphingomyéline se produit par l'intermédiaire d'une famille de sphingomyélinases neutres (nSMase) qui hydrolysent le résidu phosphocholine pour libérer des céramides (figure 10). Il existe 3 isoformes de nSMase (nSMase 1, nSMase2, et nSMase 3) présents dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Clarke et al., 2006). L'isoforme nSMase2 est la nSMase la plus étudiée et a émergé comme un médiateur clé dans la génération de céramides en réponse à différents stress pour affecter un ensemble diversifié de voies de signalisation, y compris dans le domaine du cancer, de la croissance, et du développement, et dans les réponses inflammatoires (Clarke and Hannun, 2006).

## ***III. Insulinorésistance musculaire***

### ***III.1 Importance du muscle dans l'apparition du diabète de type 2***

La résistance à l'insuline est la conséquence d'une diminution de la capacité des tissus cibles périphériques à répondre correctement à des concentrations circulantes d'insuline normales.

Bien que le site de défaut primaire d'apparition de l'insulinorésistance reste encore débattu, le muscle, qui intervient pour 80 à 90 % dans le captage et l'utilisation du glucose, se trouve au centre de la pathogénie en étant le site principal de l'insulino-résistance périphérique (de Lange P. et al., 2008; Patti and Corvera, 2010). Ainsi, les mécanismes cellulaires régulant l'absorption du glucose dans les muscles squelettiques ont un impact majeur sur l'ensemble de l'homéostasie glucidique. Chez des patients diabétiques, plus de 90% de la perte du captage du glucose en présence d'insuline au niveau du corps entier peut être attribuée à une



résistance à l'action de l'hormone dans les muscles squelettiques (DeFronzo, 1988; DeFronzo et al., 1985). De plus, l'entrée du glucose dans les muscles squelettiques est l'étape limitant la vitesse de son utilisation dans des conditions physiologiques et donc un site important de résistance à l'insuline chez les patients diabétiques.

### ***III.2 Altération du signal insulinique***

Les défauts de signalisation peuvent tout d'abord résider au niveau du récepteur de l'insuline lui-même. Une diminution du nombre de récepteurs de l'insuline a été observée dans des adipocytes isolés de sujets obèses (Molina et al., 1989). Par contre, ce défaut n'a pu être remarqué dans le muscle, ni dans le foie (Caro et al., 1987), et la diminution de la liaison de l'insuline à son récepteur ne semble pas être corrélée avec l'apparition du diabète (Arner et al., 1986; Lonnroth et al., 1983). Par contre, une diminution de l'activité kinase stimulée par l'insuline et de l'autophosphorylation du récepteur ont été observés (Youngren et al., 2001; Nyomba et al., 1990). Néanmoins, ces défauts peuvent même être abrogés suite à une perte de poids corporel (Freidenberg et al., 1988). De plus, un défaut d'internalisation du récepteur de l'insuline à la suite de la liaison de l'hormone est aussi associé à l'obésité et au diabète (Molina et al., 1989). Cependant, ces défauts restent modestes, et sont même parfois absents. Des altérations de la voie insulinique post récepteur semblent donc mieux expliquer l'apparition de la résistance à l'insuline musculaire.

Une augmentation de l'expression de la sous-unité régulatrice de la PI3-kinase p85 $\alpha$  pourrait expliquer certains cas de résistance à l'insuline (Barbour et al., 2004; Barbour et al., 2005), dont celle reliée à l'obésité (Bandyopadhyay et al., 2005). En effet, l'augmentation d'expression de la p85 $\alpha$  changerait la stœchiométrie entre le p85 libre et le complexe p85-p110 et empêcherait le complexe p85-p110 de se lier avec IRS1 et ainsi de propager le signal insulinique (Draznin, 2006).

Cependant, la majorité des études tendent vers deux cibles en priorité : IRS1 et la PKB/Akt. Chez les sujets diabétiques, l'insuline stimule moins efficacement son association avec la PI3K. La diminution de l'utilisation du glucose *in vivo* corrèle très bien avec cette signalisation défectueuse (Cusi et al., 2000).

Bien sûr, la réduction de l'activité du récepteur peut expliquer une partie de la déficience, mais la phosphorylation d'IRS-1 sur ses résidus sérine marque un mécanisme plus général (Draznin, 2006).

Dans des conditions d'insulinorésistance, IRS1 est phosphorylé sur de nombreux résidus sérines, empêchant ainsi l'insuline d'induire la phosphorylation de résidus tyrosines responsables de l'activation d'IRS1. IRS1 contient au moins 40 sites sérines/thréonines potentiels qui peuvent être phosphorylés par de nombreuses kinases telles que JNK, IKK, ERK, mTOR, et certaines PKC. Ces phosphorylations «négatives» d'IRS1 stimulent la dégradation d'IRS1 ou/et inhibent l'association d'IRS1 avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-kinase.

Les principaux résidus sérines associés avec l'insulinorésistance sont la Ser307 (Ser312 chez les humains) et la Ser636 (Ser632 chez les rongeurs) (Copps and White, 2012). La Ser307 est localisée près du domaine PTB d'IRS1 et sa phosphorylation inhibe la liaison d'IRS1 avec le récepteur à l'insuline (Aguirre et al., 2000). La Ser636 est localisée près du domaine SH2 et sa phosphorylation inhibe la liaison d'IRS1 avec la PI3K (Bouzakri et al., 2003).

L'activation de la JNK par des acides gras libres, un stress et l'inflammation augmente aussi la phosphorylation d'IRS1 sur résidus sérine, bloquant ainsi le signal insulinique (Bandyopadhyay et al., 2005; Gao et al., 2004; Hirosumi et al., 2002; Nguyen et al., 2005).

Le TNF $\alpha$  dont l'expression est augmentée dans le tissu adipeux de patients ou d'animaux obèses et insulino-résistants joue aussi un rôle important en bloquant l'activation d'IRS1 par l'insuline en induisant la phosphorylation de la protéine sur résidus sérine (Hotamisligil et al., 1996).

Des études ont aussi montré que la voie de signalisation mTOR, activée par une surcharge alimentaire chronique, peut aussi inhiber l'activation d'IRS1 en réponse à l'insuline via sa phosphorylation sur résidus sérine (Tremblay and Marette, 2001; Um et al., 2004). Et il a été montré qu'une diminution de la signalisation mTOR en réponse à l'activité physique jouait un rôle régulateur important sur la phosphorylation d'IRS1 au niveau musculaire en diminuant la phosphorylation d'IRS1 sur résidus sérine (Glynn et al., 2008).

Certaines PKCs comme les PKC $\epsilon$  (foie) et PKC $\zeta$  (muscle) ont aussi été montrées comme pouvant induire une insulinorésistance *via* la phosphorylation d'IRS1(muscle) sur résidus sérine en réponse à des dérivés secondaires d'acides gras comme les diacyl-glycérols (DAG) (Yu et al., 2002) et la réduction de la phosphorylation d'IRS2 (foie) sur résidu tyrosine (Morino et al., 2006).

### ***III.3 Accumulation ectopique de lipides, cause majeur de l'insulinorésistance musculaire***

L'obésité prédispose les individus au développement d'une résistance à l'insuline notamment au niveau du foie et des muscles squelettiques. Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer comment un excès lipidique pouvait interférer avec le métabolisme de glucose et inhiber l'action de l'insuline. Jusqu'à il y 15 ans, l'hypothèse classique du «cycle de Randle» semblait la meilleur explication pour comprendre la relation entre le métabolisme des carbohydrates et le métabolisme lipidique et particulièrement le rôle délétère des acides gras sur l'action de l'insuline et sur le métabolisme du glucose dans les tissus insulino-sensibles.

En 1963, Philip Randle a proposé l'existence d'un cycle glucose-acide gras dans les cellules qui jouerait un rôle crucial dans le développement du diabète (Randle et al., 1963). En effet, l'augmentation substantielle des acides gras libres (excès d'énergie, excès d'ATP) aurait pour conséquence une inhibition du métabolisme du glucose. Ceci serait la conséquence d'une oxydation accrue de ces acides gras qui induiraient une augmentation de citrate cytosolique, conduisant à une accumulation de glucose-6-phosphate. Ceci provoquerait alors une inhibition allostérique de l'hexokinase, responsable de la transphosphorylation du glucose en G6P, conduisant à une inhibition de la glycolyse et à une augmentation de la concentration intracellulaire en glucose, aussi qu'à l'inhibition de son transport vers l'intérieur de la cellule. Pendant plus de trente ans, ce cycle glucose/acide gras a été accepté. Il a fallu attendre la fin des années 90 pour que de nouvelles études remettent ce cycle à jour et le remettent partiellement en cause. En effet, certaines prédictions du cycle de Randle ont été mises à mal par l'utilisation de nouvelles techniques comme l'utilisation de la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) qui permet de mesurer la concentration de métabolites dans des tissus biologiques *in vivo*. Contrairement à ce qu'avait prédit Randle, cette technique a permis de montrer entre autre qu'une accumulation des acides gras libres dans le muscle diminuait plutôt la concentration de glucose intracellulaire (Roden et al., 1996). Il semblerait donc que le cycle de Randle ne soit qu'un des nombreux mécanismes par lesquels les acides gras influencent l'action de l'insuline et le métabolisme du glucose dans les tissus insulino-sensibles.

Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence une relation de cause à effet entre une accumulation d'acides gras dans le muscle et l'apparition d'une résistance à l'insuline,

entraînant une inhibition du transport du glucose dans cet organe (Dresner et al., 1999; Garvey et al., 1998). Chez l'homme, il est maintenant clair qu'il existe une forte corrélation entre les concentrations intramusculaires en lipides et l'insulinorésistance (Muio and Newgard, 2008; Dobbins et al., 2002).

De fortes évidences existent donc entre une accumulation ectopique de lipides et l'insulinorésistance. Cependant, dans certains cas comme le « paradoxe de l'athlète », une telle corrélation est absente. En effet, les athlètes présentent normalement une hypersensibilité à l'insuline, tout en accumulant des graisses intramusculaires (Goodpaster et al., 2001). Ainsi, il semble donc que la présence de lipides dans des tissus non-adipeux ne puisse pas être considérée comme une cause directe de la perte de sensibilité à l'insuline des tissus.

Même s'ils ne semblent pas être directement impliqués, il est maintenant évident que les acides gras jouent un rôle indirect dans la progression de la perte de sensibilité des tissus à l'insuline en activant des voies de signalisation délétères et/ou en servant de substrat pour la synthèse de dérivés lipides secondaires aux propriétés tout aussi délétères.

### ***III.4 Conséquences de l'accumulation ectopique de lipides.***

#### ***III.4.1 Stress du réticulum endoplasmique***

Le réticulum endoplasmique est le siège de nombreuses fonctions cruciales au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il a pour fonction entre autre, la synthèse des macromolécules lipidiques, ou encore la synthèse des protéines sécrétées ou membranaires. Siège de la traduction protéique, les protéines en cours de formation y sont repliées avec l'aide (ou non) de protéines chaperonnes, puis acheminées ensuite vers l'appareil de Golgi où se dérouleront les modifications post-traductionnelles avant leur sécrétion dans le cytoplasme.

Quand le repliement des protéines est inhibé ou défectif dans le RE, des voies de signalisation sont activées dont le but est:

- de diminuer la biosynthèse des protéines afin de réduire leur accumulation dans la lumière du RE.
- d'augmenter la biosynthèse des protéines chaperonnes.
- d'augmenter la biosynthèse des protéines impliquées dans la machinerie de dégradation des protéines associées au RE ("*ER-associated degradation*" - ERAD).
- d'aider le RE à recouvrer son homéostasie (calcique en particulier)

L'ensemble de ces voies de signalisation constitue une réponse adaptative physiologique de la cellule à l'accumulation de protéines mal repliées et s'appelle "*Unfolded Protein Response*" ou réponse UPR.

Il existe trois médiateurs proximaux de la réponse UPR: IRE-1(Inositol requiring enzyme 1), PERK (PKR-like eR protein kinase) et ATF6 (Activating transcription factor 6). L'interaction des protéines PERK, ATF6 et IRE-1 avec la protéine chaperonne BiP/GRP78 dans le RE les maintient inactive. Cependant, l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE entraîne la dissociation des ces protéines des chaperonnes et permettent leur activation :

**IRE-1** possède deux types d'activité enzymatique: une activité Ser/Thr kinase et une activité endoribonucléase.

La dissociation du complexe [IRE-1 - Bip/GRP78] entraîne une dimérisation d'IRE-1, induisant son activité kinase. IRE-1 peut alors s'autophosphoryler ce qui stimule son activité endoribonucléase. Cette dernière est régulée par la dimérisation d'IRE-1 et par la fixation d'un nucléotide di- ou tri-phosphate (Oikawa et al., 2005).

IRE-1 ainsi activé épisse dans le cytoplasme l'ARN messager codant pour le facteur de transcription XBP1. XBP1 est un intron de 26 paires de bases (chez l'homme) qui augmente la transcription de protéines chaperonnes permettant l'acheminement des protéines mal conformées vers le protéasome, lieu de leur dégradation (Sidrauski and Walter, 1997; Kaser et al., 2008). XBP1 se lie sur des séquences ERSE « Endoplasmic Reticulum Stress response Element » - des promoteurs de gènes de l'UPR (Schroder and Kaufman, 2005).

**ATF6** est normalement attaché à la membrane du réticulum endoplasmique. Lors de la détection d'un stress, la dissociation de BiP/GRP78 d'ATF6 permet à cette dernière de migrer vers l'appareil de Golgi (Chen et al., 2002), où les protéases S1P et S2P ("*site-1 protease*" et "*site-1 protease*") hydrolysent ATF6. Cette coupure protéolytique permet au domaine N-terminal d'ATF6, un facteur de transcription, de migrer vers le noyau où il se fixe sur des séquences ERSE et régule l'expression d'un ensemble de chaperonnes du RE comme BiP/GRP78 et GRP94.

**PERK** se dimérise après dissociation d'avec BiP/GRP78, stimulant ainsi son activité kinase qui va phosphoryler la sous unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor 2) sur sa sérine 51. Ceci entraîne ainsi une diminution générale de

la synthèse protéique au sein de la cellule (Harding et al., 1999). La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  permet aussi la transcription d'ATF4 (activating transcription factor 4) (Hetz et al., 2011) qui va induire principalement la transcription des gènes CHOP (C/EBP homologous protein), TRB3 (tribbles homolog 3), et GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein), tous impliqués dans l'induction de l'apoptose.

L'activation concomitante de PERK, ATF6 et IRE1 induira l'inhibition de la synthèse protéique et augmentera les capacités de repliement des protéines du RE. Elle induira aussi l'élimination des protéines mal repliées afin de protéger le RE. Toutefois, lorsque le stress sera prolongé ou trop sévère, la réponse UPR ne sera pas en mesure de rétablir l'homéostasie du réticulum et aboutira à la mort cellulaire par apoptose dans le but de protéger l'organisme.

Il a été établi une relation entre le stress du réticulum endoplasmique et des pathologies métaboliques telles que l'obésité et/ou le diabète de type 2 (Nakamura et al., 2010; Zhang et al., 2006). Chez l'humain obèse, un bypass gastrique et la perte de poids qui s'ensuit induisent une réduction de ce stress au sein du tissu adipeux (Gregor et al., 2009). Par ailleurs, l'obésité est un facteur d'induction du stress du réticulum endoplasmique, notamment dans le foie et le tissu adipeux de souris, ce qui participe à l'insulinorésistance. La mise en place de la réponse UPR dans les cellules hépatiques entraîne notamment une diminution de la phosphorylation sur tyrosine de IRS1 (Ozcan et al., 2004). Parallèlement à ce phénomène, l'induction de la JNK par IRE-1 (Urano et al., 2000) augmente les phosphorylations inhibitrices (sérine) sur IRS1. Au niveau du tissu adipeux, il a été montré que l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique dans l'adipocyte de souris inhibait le transport de glucose stimulé par l'insuline (Parker et al., 2005).

Concernant le muscle squelettique, si la lipotoxicité a été associée à un stress du réticulum endoplasmique, l'ampleur de l'activation de ce dernier ne semble pas suffisante pour relayer les effets délétères des lipides sur la sensibilité à l'insuline (figure 14) (Hage Hassan et al., 2012; Rieusset et al., 2012).

#### ***III.4.2 Dysfonctionnement mitochondrial et Stress oxydant***

Plusieurs données accumulées au cours de la dernière décennie indiquent qu'un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydant joue un rôle important dans les phénomènes d'insulinorésistance musculaire (Anderson et al., 2009; Bonnard et al., 2008). Il a été montré qu'un stress oxydant, qui se produit dans les cellules lorsque l'équilibre entre les

espèces pro-oxydantes et la défense antioxydante est rompu et favorise le stress oxydant, conduit à une insulino-résistance. Un stress oxydant est le résultat d'une augmentation de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et/ou d'espèces réactives au nitrogène (RNS). Ces espèces, qui oxydent directement et abiment l'ADN, les protéines et les lipides, ont été montrées dans plusieurs études comme contribuant aux complications du diabète (Hoehn et al., 2009; Bonnard et al., 2008; Anderson et al., 2009).

Le muscle squelettique est particulièrement altéré par un stress oxydant chronique du fait qu'il a besoin de grandes quantités d'oxygène pour fonctionner et que son état post-mitotique le rend particulièrement vulnérable à l'accumulation de ces espèces au cours du temps. En effet, de nombreuses études *in vitro* ont montré que l'incubation de cellules musculaires avec un acide gras saturé (palmitate) induit un dysfonctionnement mitochondrial, une augmentation de la production de ROS et une insulino-résistance (Duval et al., 2007; Hoehn et al., 2009). *In vivo*, des stratégies protectives en utilisant des antioxydants ont permis d'améliorer la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique de rats nourris avec un régime hyperlipidique (Vinayagamoorthi et al., 2008; Gupte et al., 2009).

Récemment cependant, une étude publiée dans *Diabetologia* a remis en cause ces données en utilisant un antioxydant spécifique de la mitochondrie (plastoquinonyl decyltriphenylphosphonium, SkQ) pour cibler la production de ROS dans des myotubes C2C12 traités avec du palmitate *in vitro*, ou dans des rats rendus insulino-résistants par un régime hyperlipidique. Comme attendu, le traitement par le SkQ a réduit la production mitochondriale de ROS en réponse au palmitate et a empêché l'apparition d'un stress oxydant chez les rats nourris avec le régime hyperlipidique. Cependant, ni la stimulation du transport du glucose par l'insuline, ni la tolérance au glucose, ni l'activation de la voie de signalisation insulinique n'ont été améliorées dans les conditions de résistance à l'insuline en présence du SkQ (Paglialunga et al., 2012). Ces résultats suggèrent donc qu'un stress oxydant produit en réponse à un excès lipidique n'est peut-être pas pré-requis pour le développement d'une insulino-résistance musculaire.

### ***III.4.3 Inflammation***

Il est maintenant clair qu'une inflammation chronique de bas-grade et une activation du système immunitaire sont impliquées dans la pathogénèse du diabète de type 2. Si le tissu adipeux est le premier tissu où un lien entre inflammation et insulino-résistance a été mis en évidence (Hotamisligil et al., 1995), des infiltrations macrophagiques dans le foie, le pancréas

et le muscle ont aussi été observées dans des modèles animaux de diabète et d'obésité, mais aussi chez des patients humains diabétiques et insulino-résistants. Les macrophages sont responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  (Chawla et al., 2011).

Les acides gras saturés peuvent induire une inflammation par 2 voies intracellulaires distinctes :

- Indirectement : *via* la sécrétion de cytokines comme le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 (Hotamisligil, 2006; Wen et al., 2011).
- Directement : *via* leur interaction avec des membres de la famille des Toll-like receptor (famille TLR).

**Le TNF- $\alpha$**  (facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ ), cytokine pro-inflammatoire, est un médiateur paracrine produit par les adipocytes qui peut agir localement en réduisant la sensibilité à l'insuline des cellules (Lau et al., 2006). Des modèles animaux, ainsi que des études menées sur l'homme ont montré que les patients diabétiques et les sujets obèses ont une production augmentée de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux (Hotamisligil et al., 1995). L'action paracrine du TNF- $\alpha$  amplifierait la libération des acides gras libres, induisant ainsi une dyslipidémie athérogène (Rosenson et al., 2004). Les concentrations de TNF- $\alpha$  plasmatique sont associées positivement avec le poids corporel, les triglycérides (TG), alors qu'une association négative existe entre le TNF- $\alpha$  circulant et les concentrations d'HDL-cholestérol élevées (Xydakis et al., 2004).

Il a été montré que le TNF- $\alpha$  peut induire une résistance à l'insuline chez l'homme en inhibant la voie de signalisation insulinaire en empêchant l'activation de deux cibles : IRS1 et AS 160 (Hotamisligil and Spiegelman, 1994; Plomgaard et al., 2005). Le TNF $\alpha$  est aussi un régulateur important des concentrations sphingolipidiques intracellulaires. En effet, le TNF $\alpha$  induit l'hydrolyse des sphingomyélines et conduit ainsi à une accumulation rapide de céramides intracellulaires (Gu et al., 2013). Un des effets des céramides est d'activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui est impliqué dans la réponse inflammatoire *via* l'augmentation d'expression de diverses cytokines, chimiokines, chimioattractants, et d'enzymes pro-inflammatoires comme la cyclo-oxygénase 2 (COX2) (Sarkar et al., 2004).



Les concentrations de TNF- $\alpha$  plasmatique sont associées positivement avec le poids corporel, les triglycérides (TG), alors qu'une association négative existe entre le TNF- $\alpha$  circulant et les concentrations d'HDL-cholestérol élevées (Xydakis et al., 2004).

L'activation des voies pro-inflammatoires est décrite dans l'insulinorésistance (Olefsky and Glass, 2010; Schenk et al., 2008). L'inflammation chronique inhibe la sensibilité à l'insuline *via* l'activation des voies de signalisation altérant directement la voie de signalisation insulinique (Schenk et al., 2008; Hotamisligil and Erbay, 2008). L'inflammation altère la sensibilité à l'insuline *via* la famille de Toll-Like Receptor (TLR) (Plomgaard et al., 2005).

**Le récepteur TLR-4** est important dans le système immunitaire inné. TLR-4 est une protéine transmembranaire de type I qui comporte un domaine extracellulaire récepteur du signal de danger composé de nombreux motifs LRR (leucin-rich repeats), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire contenant un « death domain » permettant la transduction du signal d'activation. TLR4 contribue au développement de l'insulinorésistance et de l'inflammation *via* son activation par des ligands exogènes (les acides gras alimentaires et les lipopolysaccharides LPS) et des ligands endogènes (les acides gras libres élevés dans le cas de l'obésité) (Kim and Sears, 2010). Dans le muscle squelettique, ce récepteur est activé par les acides gras et active le complexe JNK-IKK $\beta$ . L'activation de JNK et IKK par les acides gras saturés est associée à une inhibition de l'action de l'insuline, conséquence d'une phosphorylation d'IRS1 sur résidus sérine et de l'inhibition de la phosphorylation activatrice des résidus tyrosine d'IRS1 (Hotamisligil and Erbay, 2008; Hotamisligil et al., 1993). De plus, l'inflammation peut induire la synthèse de dérivés secondaires comme les céramides, à partir des acides gras saturés. Des études montrent qu'un traitement avec du palmitate augmente les concentrations de cytokines plasmatiques chez les rongeurs et que les souris dépourvues de récepteurs TLR4 sont protégées de l'accumulation de céramides et de l'insulinorésistance induite par les acides gras saturés (Holland et al., 2011).

Ainsi, les céramides intracellulaires pourraient jouer le rôle de seconds messagers qui coordonnent la réponse cellulaire aux cytokines circulants ou aux signaux des acides gras saturés (Samuel and Shulman, 2012).

Dans le muscle, des infiltrations macrophagiques pro-inflammatoires ont été observées chez des souris obèses, particulièrement au niveau du tissu adipeux résidant entre les fibres musculaires (Weisberg et al., 2003; Nguyen et al., 2007). Cependant, les quantités de macrophages observées au niveau des fibres musculaires sont bien moindres que celles

observées dans le tissu adipeux ou le foie (Tam et al., 2012), et des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer si l'inflammation musculaire joue vraiment un rôle dans l'établissement d'une résistance à l'insuline dans ce tissu (figure 14).

### **L'inflammasome**

L'inflammasome est un complexe multiprotéique formé en présence de pathogènes et induit par les lipopolysaccharides et les acides gras. L'inflammasome active la caspase 1 et induit la sécrétion des interleukines IL-1 $\beta$  et IL-8 comme une première barrière de défense dans la réponse immunitaire (Legrand-Poels et al., 2014). L'inflammasome est formé de la famille NLR (Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Repeat containing proteins), constituée de 6 membres NLRPs (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4), et de la famille PYHIN, Pyrin and HIN200 (haematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino-acid repeat domain-containing protein).

Les acides gras saturés, et leurs dérivés lipidiques appelés céramides, sont connus pour induire l'inflammation durant l'obésité (Haversen et al., 2009), et plus particulièrement *via* l'activation des NLRPs. Dans le contexte de l'obésité et l'insulinorésistance, NLRP3 (le mieux caractérisé dans la famille de l'inflammasome) est activé dans les macrophages du tissu adipeux (Stienstra et al., 2011), dans les cellules  $\beta$  pancréatique et dans les îlots infiltrés de macrophages (Donath, 2011; Donath, 2013), contribuant à l'apoptose et à un défaut de sécrétion de l'insuline. De plus, l'activation de NLRP3 est corrélée avec une stéatose hépatique non alcoolique observée chez les rongeurs (Csak et al., 2011).

Une activation de l'inflammasome a aussi été observée chez des souris insulino-résistantes (souris sous régime hyperlipidique). Par contre, quand le gène codant pour NLRP3 a été invalidé chez ces souris, la stéatose hépatique est amoindrie et l'activité de l'inflammasome est diminuée par rapport aux souris sauvages insulino-résistantes (Vandanmagsar et al., 2011). L'activation de NLRP3 en réponse aux acides gras saturés et à leurs dérivés sphingolipidiques (céramides) a été étudiée par plusieurs groupes de recherche (Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011). Ils montrent que NLRP3 détecte la lipotoxicité induite par les céramides en activant la caspase 1 dans les macrophages et le tissu adipeux. De plus, Vandanmagsar et al (2011) ont montré qu'une perte de poids chez des patients obèses et insulinorésistants diminue l'expression de NLRP3 dans le tissu adipeux sous-cutané. Ceci est accompagné d'une amélioration de l'homéostasie glucidique (Vandanmagsar et al., 2011).

L'expression de NLRP3 est contrôlée à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau de son activité. La transcription du gène NLRP3 est activée par les récepteurs TLR4 et récepteurs

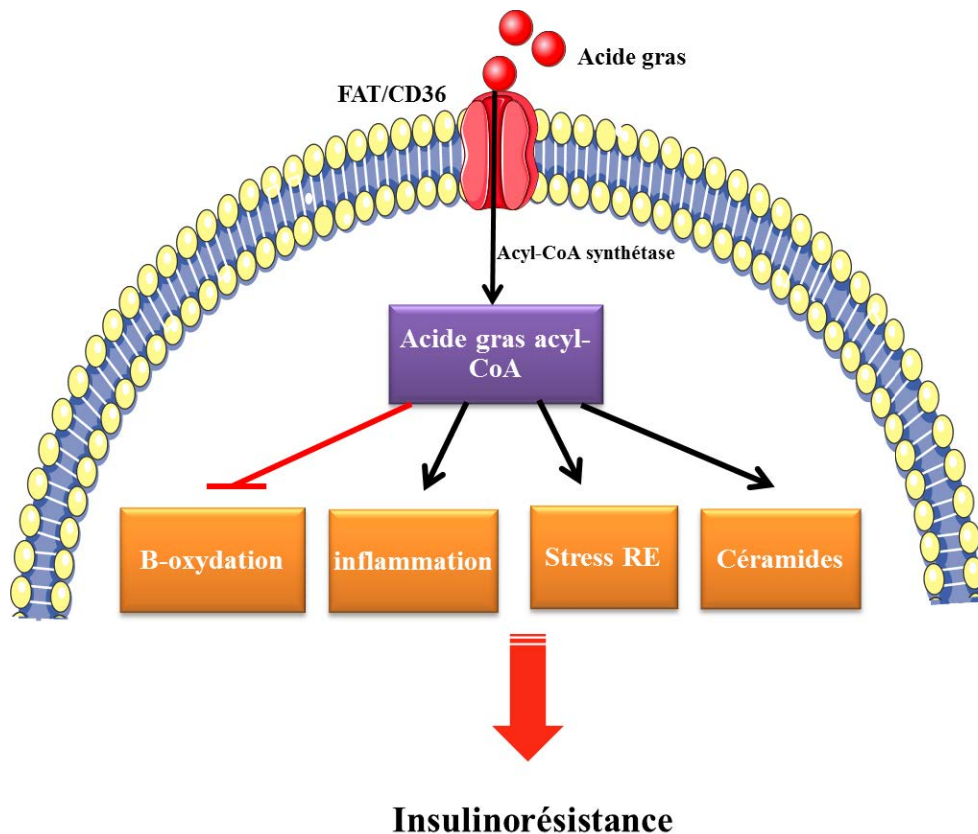
TNF $\alpha$  via l'activation de la NF-kB. De plus, le palmitate, *via* la production de céramides et l'accumulation de ROS (reactive oxygen species), (i) altère la structure mitochondriale, (ii) déstabilise le lysosome, (iii) altère l'intégrité du RE, activant ainsi NLRP3 (Wen et al., 2011) (Murakami et al., 2012).

Peu de données existent au niveau musculaire. Une étude montre la surexpression de l'inflammasome dans les cellules musculaires de patients atteints de myopathie, suggérant que NLRP3 pourrait aussi être activé dans les cellules musculaires (Rawat et al., 2010).

#### ***III.4.4 Production de dérivés lipidiques délétères***

La nature et le degré de saturation des acides gras libres (saturés ou insaturés) sont essentiels dans le développement de l'insulinorésistance cellulaire. Si de nombreuses études ont montré que les acides gras saturés sont associés à une insulinorésistance (Hunnicut et al., 1994; Vessby et al., 2001), les acides gras insaturés ont une action opposée et améliorent la sensibilité à l'insuline des cellules (Ryan et al., 2000). Ainsi, le palmitate (acide gras saturé) induit une insulinorésistance musculaire (Chavez and Summers, 2003; Turpin et al., 2006) alors qu'un acide gras insaturé comme l'oléate améliore la sensibilité musculaire à l'insuline (Dimopoulos et al., 2006; Coll et al., 2008).

S'il a été montré que les acides gras saturés pouvaient altérer la sensibilité à l'insuline par plusieurs voies distinctes (dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydant, inflammation), ils sont aussi à l'origine de la production de dérivés lipidiques bioactifs secondaires comme les céramides et les diacylglycérols (DAG) qui jouent un rôle crucial comme médiateurs des effets délétères des acides gras sur la sensibilité à l'insuline cellulaire (figure 13).



**Figure 13: Mécanismes induisant l'insulinorésistance dans le muscle squelettique.**

L'excès d'acides gras saturés altère la  $\beta$ -oxydation et stimule l'inflammation, le stress RE et la production de céramides dans les cellules musculaires.

Depuis longtemps, une corrélation inverse entre concentrations musculaires de céramides et de DAG et sensibilité à l'insuline a été mise en évidence chez des animaux insulinorésistants (Turinsky et al., 1990). De même, chez l'homme, les concentrations de céramides sont très augmentées dans les muscles de patients obèses, et une corrélation négative a été observée entre ces concentrations et la sensibilité à l'insuline (Strackowski et al., 2004).

#### *i) Diacylglycérols (DAG)*

Les DAG sont des glycérides composés de deux chaînes des acides gras liées d'une manière covalente à une molécule de glycérol. Les DAG, intermédiaires dans le métabolisme des phospholipides et des triglycérides, sont des importants seconds messagers impliqués la signalisation intracellulaire (Brose et al., 2004).

L'accumulation des DAG a souvent été observée dans des foies insulinorésistants (Kotronen et al., 2009; Puri et al., 2007) et l'activation de la protéine kinase  $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) par les DAG a aussi été associée à l'insulinorésistance hépatique (Samuel et al., 2007). De nombreuses

études ont décrypté les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la signalisation insulinique *via* l'activation des PKCs par les DAG et elles montrent toutes que les IRSs sont les cibles préférentielles des PKCs. Les PKC inhibent l'activation des IRSs en réponse à l'insuline *via* la phosphorylation sur résidus sérine, en empêchant ainsi leur phosphorylation sur résidus tyrosine (van Herpen and Schrauwen-Hinderling, 2008).

Dans le muscle, les données sont contradictoires. Une étude a montré l'association positive entre le contenu des DAG et l'insulinorésistance musculaire en comparant un groupe de sujets recevant un bolus lipidique avec un groupe contrôle (Itani et al., 2002). D'autres études ont ensuite confirmé ces résultats et ont montré que le contenu musculaire en DAG est inversement corrélé à la sensibilité à l'insuline (Strackowski et al., 2007a).

Cependant, certaines études ont remis en question ces résultats. Anastasiou et coll ont comparé des sujets obèses et diabétiques avec des patients non-diabétiques et n'ont trouvé aucune variation des concentrations de DAG dans les deux groupes (Anastasiou et al., 2009). Des résultats similaires ont été trouvés par Perreault et coll chez des sujets obèses (Perreault et al., 2010). Plus intrigant, Amati et coll ont observé une augmentation par deux des concentrations de DAG dans des biopsies musculaires d'athlètes insulinosensibles comparés à des patients insulinorésistants (Amati et al., 2011). Plus récemment, ce groupe n'a montré aucune différence de concentrations de DAG entre des patients diabétiques et des sujets contrôles (Coen et al., 2013).

De plus, des études effectuées *in vitro* dans des myotubes en culture ou sur du muscle isolé de rongeur ont montré que les DAG ne contribuent pas à l'insulinorésistance induite par les acides gras saturés (le palmitate). En effet, dans ces modèles, l'administration d'inhibiteurs de la voie de synthèse *de novo* des céramides restaure complètement la sensibilité à l'insuline des cellules, malgré des concentrations élevées de DAG (Chavez and Summers, 2003; Holland et al., 2011), suggérant ainsi que les DAG sont de faibles inducteurs de l'insulinorésistance musculaire au contraire des céramides.

## **ii) Céramides**

Dans des conditions d'obésité, ce ne sont pas les acides gras saturés comme le palmitate (acide gras saturé majoritaire dans les régimes gras) qui sont délétères mais principalement leurs dérivés sphingolipidiques appelés céramides qui s'accumulent dans les tissus insulinosensibles (Hannun, 1994). En effet, plusieurs études utilisant différents modèles murins d'insulinorésistance (souris ob/ob ; souris nourries avec un régime hyperlipidique ; souris injectées avec un bolus lipidique) ont montré une augmentation des concentrations

intramusculaires de céramides (Holland and Summers, 2008; Yang et al., 2009; Ussher et al., 2010). Des résultats similaires ont été mis en évidence chez des patients diabétiques comparé à des sujets insulinosensibles (Coen et al., 2013; Amati et al., 2011). Enfin, ces observations ont été confirmées *in vitro* en exposant des myotubes en culture à du palmitate. Dans ces conditions, une diminution de la stimulation de la synthèse de glycogène et du transport de glucose en réponse à l'insuline a été observée parallèlement à une augmentation des concentrations de céramides dans les cellules (Powell et al., 2004a; Schmitz-Peiffer et al., 1999a). De plus, l'incubation de cellules musculaires avec des analogues de céramides mime l'effet négatif du palmitate sur la voie de signalisation insulinique (Hajdуч et al., 2001; Summers et al., 1998).

Parmi les éléments de la voie de signalisation de l'insuline susceptibles d'être affectés par les céramides, IRS1 a été évoqué par plusieurs laboratoires (Paz et al., 1997; Peraldi and Spiegelman, 1997; Kanety et al., 1996). IRS1 serait phosphorylé sur des résidus Sérine et ainsi inactivé par les céramides, *via* l'activation de certaines kinases telles que p38, JNK (c-Jun N-terminal kinase) et IKK (NFkB inhibitor kinase) (Ruvolo, 2003; Gual et al., 2005). La PI3K pourrait elle-aussi être une cible des céramides (Zundel and Giaccia, 1998; Zundel et al., 2000).

Cependant, l'implication de ces deux cibles est sujette à controverse car des études ont montré que les céramides n'altèrent pas la production des PIP3 produits par la PI3K (Schubert et al., 2000; Hajdуч et al., 2001), ni l'activation de la PDK1 (Stratford et al., 2004; Salinas et al., 2000; Hajdуч et al., 2001). De plus, il a été montré que l'inhibition de la voie insulinique par les céramides *via* un agoniste extracellulaire (platelet-derived growth factor) n'impliquait pas IRS1 (Salinas et al., 2000; Stratford et al., 2001; Zhou et al., 1998).

Un consensus relatif existe maintenant pour dire que la PKB/Akt, protéine kinase essentielle pour la propagation du signal insulinique, serait la cible privilégiée des céramides. En effet, des défauts d'activation de cette protéine en réponse à l'insuline ont été observés dans de nombreux types cellulaires comme les adipocytes blancs et bruns, les muscles squelettiques et lisses, les cellules mammaires et les cellules neuronales (Summers, 2006).

### ***Mécanismes d'action des céramides***

Les céramides altèrent la PKB/Akt au niveau musculaire *via* l'un des deux mécanismes non exclusifs:

- Le premier mécanisme implique l'activation d'une phosphatase appelée PP2A.

- Le second mécanisme implique une famille de PKCs, les PKC atypiques.

i) Voie “PP2A”

La PP2A est une sérine/thréonine phosphatase cytoplasmique exprimée de manière ubiquitaire qui déphosphoryle une multitude de substrats *in vitro* et qui est impliquée dans la régulation de presque toutes les activités cellulaires. La délétion du gène codant pour la sous-unité catalytique de la PP2A est létale chez la levure (Kinoshita et al., 1996) et chez la souris (Gotz et al., 1998), ce qui démontre l'importance de cette phosphatase dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. L'importance générale de la PP2A dans l'homéostasie des cellules est principalement illustrée par la panoplie étonnante d'inhibiteurs naturels, le plus célèbre étant l'acide okadaïque (Honkanen et al., 1994).

Dans certaines cellules, il a été décrit que l'effet majeur des céramides serait d'activer la PP2A. La PP2A empêcherait ainsi l'activation de la PKB/Akt en réponse à l'insuline en déphosphorylant les sites sérine 473 et thréonine 308, normalement phosphorylés par l'hormone (Hage Hassan et al., 2014). Le traitement de différents types cellulaires comme la lignée musculaire C2C12, les cellules nerveuses PC12, et les adipocytes bruns avec de l'acide okadaïque a permis de mettre en évidence que la PP2A médie l'action négative des céramides sur la PKB/Akt dans ces cellules (Salinas et al., 2000; Cazzolli et al., 2001; Cho et al., 2007).

ii) Voie “PKC atypiques”

Le second mécanisme d'inactivation de la PKB/Akt par les céramides passe par une inhibition de la translocation de la PKB/Akt vers la membrane plasmique pour y être phosphorylé en réponse à l'insuline. Le processus dépend de l'activation des PKC atypiques par les céramides. En effet, de nombreuses études suggèrent que l'activation des PKC atypiques joue un rôle négatif sur le signal insulinaire et qu'à l'opposé, leur inhibition potentialise un effet sensibilisateur de l'insuline (Bourbon et al., 2000; Cortright et al., 2000; Powell et al., 2003). De plus, l'inhibition pharmacologique de l'activité des PKC atypiques empêche l'action délétère des céramides sur l'activation de la PKB/Akt par l'insuline dans les adipocytes et les myotubes L6 (Hajdúch et al., 2008). Les céramides activent directement les PKC atypiques en se liant à une région de liaison putative (Wang et al., 2009). Notre groupe a mis en évidence dans des myotubes L6 que les PKC atypiques activées par les céramides liaient et phosphorylaient la PKB/Akt sur son résidu thréonine 34/sérine 34 (dépendant de l'isoforme de la PKB/Akt) localisé au niveau du domaine PH de la kinase, rendant ainsi impossible la

liaison à ce domaine des PIP3 produits par la PI3K en réponse à l'insuline (Powell et al., 2003).

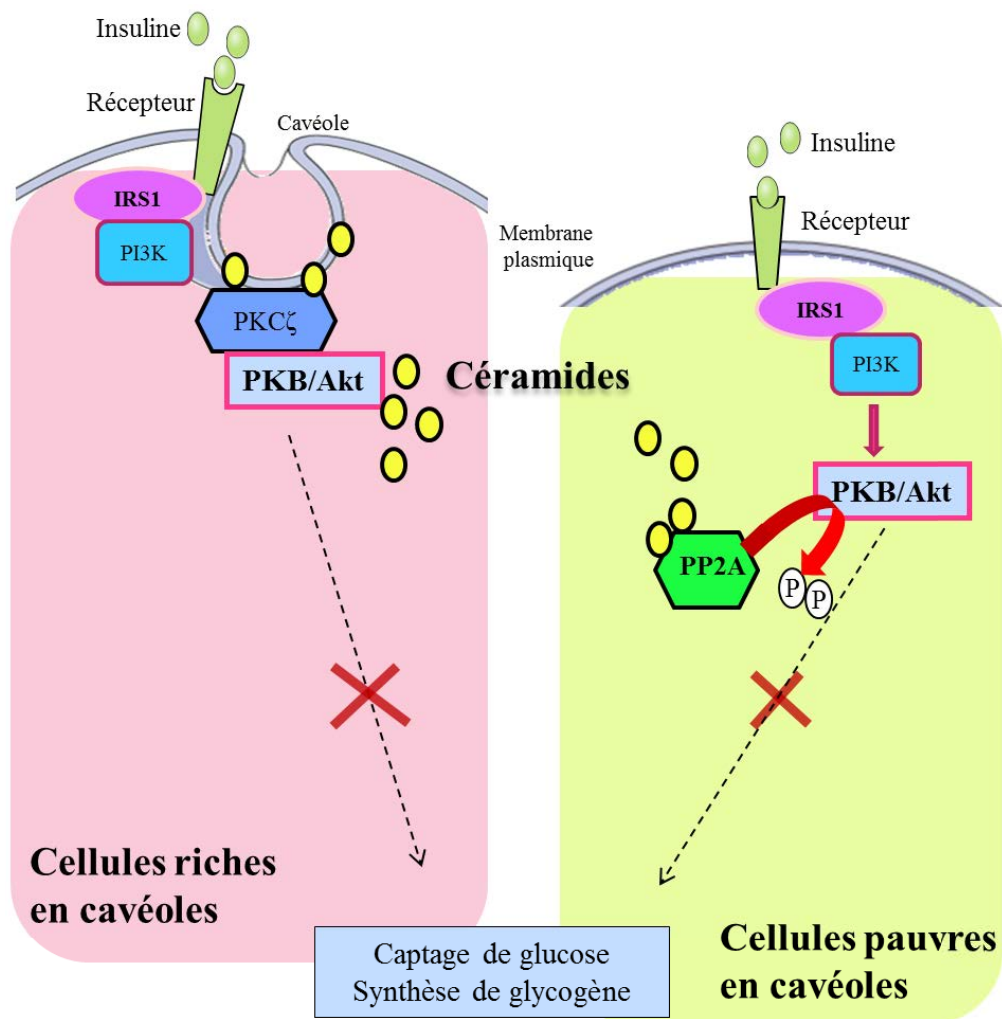
Ces résultats ont été confirmés dans des cellules musculaires lisses. Dans ces cellules, Fox et coll ont surexprimé une forme mutante de la PKB $\gamma$ /Akt3 dans lequel le résidu sérine 34 a été remplacé par un glutamate, mimant ainsi une phosphorylation permanente de la PKB/Akt, normalement seulement observée en réponse aux céramides. Comme espéré, la surexpression de ce mutant mime l'action des céramides et empêche l'activation de la PKB $\gamma$ /Akt3 par le PDGF (Fox et al., 2007). Inversement, le remplacement de la sérine 34 par une alanine, évitant ainsi toute phosphorylation de la PKB/Akt en réponse aux céramides, empêche ces derniers d'inhiber l'activation de la PKB $\gamma$ /Akt3 par le PDGF (Fox et al., 2007). Tous ces résultats montrent l'importance de la phosphorylation de la PKB/Akt par les PKC atypiques dans l'établissement de l'insulinorésistance.

*Pourquoi les céramides altèrent-ils la signalisation insulinaire via deux mécanismes différents?*

La réponse à cette question tient peut-être à des variations de compositions membranaires des différents types cellulaires étudiés. En effet, notre groupe, ainsi qu'un autre, a montré que les céramides induisent le recrutement du complexe PKC $\delta$ -PKB/Akt dans des domaines appelées cavéoles (Fox et al., 2007; Hajduch et al., 2008a). Ces microdomaines forment des plateformes lipidiques spéciales qui sont à l'origine de nombreuses voies de signalisation (Simons and Ikonen, 1997). Ces cavéoles sont enrichies en divers sphingolipides (céramides, sphingomyélines), mais aussi en cholestérol et en une protéine de structure importante appelée cavéoline (Simons and Ikonen, 1997). De manière intéressante, les cavéolines peuvent lier les PKC atypiques (Oka et al., 1997) et récemment, nous avons mis en évidence que les cellules riches en cavéoles (adipocytes, myotubes L6) inactivent la PKB/Akt en induisant la séquestration du complexe PKC $\delta$ -PKB/Akt dans les cavéoles (Blouin et al., 2010a), alors que les céramides agissent négativement sur la PKB/Akt *via* la PP2A dans des types cellulaires pauvres en cavéoles (fibroblastes) (Blouin et al., 2010a) (figure 14).

Ces résultats montrent que différentes voies existent à l'intérieur des cellules pour relayer l'action délétère des céramides sur la sensibilité à l'insuline.





**Figure 14: Mécanismes d'inactivation de la PKB/Akt par les céramides.**

- Les céramides inhibent la voie insulinaire par deux voies distinctes, suivant les concentrations cavéolaires des cellules.
- Les céramides activent la PKC $\delta$  qui phosphoryle la PKB/Akt sur son résidu Thréonine 34 et la séquestre dans les cavéoles.
- Les céramides activent la phosphatase PP2A qui déphosphoryle la PKB/Akt.

### *Exercice physique et céramide*

Plusieurs études ont essayé de rechercher si une corrélation existait entre l'exercice physique, connu pour améliorer la sensibilité à l'insuline des cellules chez les patients diabétiques (Richter et al., 2001), et les concentrations intramyocytaires de céramides, connues pour être délétères pour la sensibilité à l'insuline (voir chapitres précédents). Le rationnel de cette question est de savoir si l'exercice physique, en plus d'améliorer le captage musculaire du glucose par une voie indépendante de l'insuline (voir chapitre précédant), peut empêcher les

céramides de s'accumuler dans les cellules musculaires, et ainsi les re-sensibiliser à l'action de l'insuline.

Une étude pionnière réalisée en 2004 chez l'homme a montré que, contrairement à ce qu'on attendait, l'exercice physique aigu (3h) induisait une augmentation des concentrations musculaires de céramides (+39%) (Helge et al., 2004). Ces résultats furent confirmés par une étude similaire menée par le même groupe dans laquelle ils firent courir des rats jusqu'à épuisement (Blachnio-Zabielska et al., 2008). Dans cette dernière étude, les auteurs ont montré que l'exercice affectait fortement l'activité d'enzymes clefs du métabolisme des céramides (SPT, nSMase, aSMase, céramidase) (Blachnio-Zabielska et al., 2008).

Pour tenter d'expliquer ces résultats, les auteurs ont avancé l'hypothèse que l'augmentation des concentrations plasmatiques des acides gras libres (lipolyse) secondaire à l'exercice physique (Newsom et al., 2011), serait favorable à l'augmentation de la synthèse *de novo* des céramides.

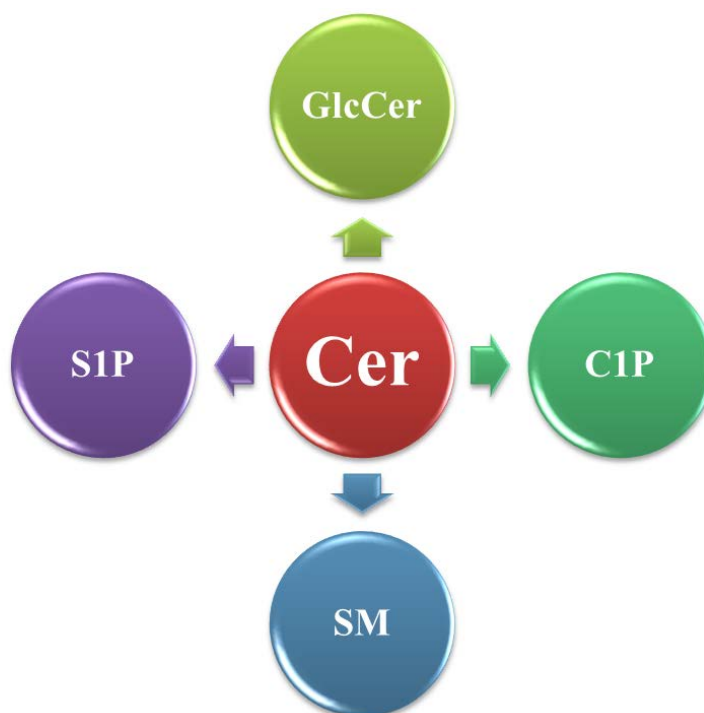
Cependant, une étude menée sur des rats entraînés pendant 6 semaines a donné des résultats différents. En effet, chez ces derniers, une diminution des concentrations de céramides intramusculaire a été observée comparés à des rats sédentaires (Lessard et al., 2007).

Les résultats de cette dernière étude ont été confirmés par la suite chez l'homme. Les concentrations en céramides dans les muscles squelettiques de volontaires non obèses sédentaires et de volontaires non obèses sportifs ont été dosées dans une première étude, et aucune différence n'a été observée (Amati et al., 2011). De plus, les concentrations de céramides chez des patients obèses sédentaires ou ayant pratiqué une activité physique modérée mais prolongée ont aussi été mesurées. De manière intéressante, trois différentes études montrent une diminution des concentrations de céramides chez les patients obèses pratiquant une activité physique comparés aux patients obèses sédentaires, sans perte de poids vraiment significative (Bruce et al., 2006; Dube et al., 2008; Devries et al., 2013). L'étude de Bruce et coll. a montré que ce sont les concentrations des céramides en C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2 et C20 qui sont diminuées (Bruce et al., 2006). Enfin, cette étude a aussi montré que l'exercice physique augmente l'activité de la CPT1, poussant ainsi les lipides vers la mitochondrie et l'oxydation et les déviant ainsi de la voie de biosynthèse des céramides (Bruce et al., 2006).

En conclusion, l'exercice physique semble avoir deux actions opposées suivant la chronicité de l'effort : (i) une action aigüe induisant une augmentation de la synthèse *de novo* des céramides et (ii) une action plus à long-terme qui dévie les lipides vers l'oxydation, réduisant ainsi les concentrations musculaires de céramides

### ***III.4.5 Importance d'autres dérivés sphingolipidiques dans la régulation de la sensibilité à l'insuline***

Une fois générés, les céramides sont le précurseur commun de plusieurs sphingolipides complexes car pouvant être glycosylés, phosphorylés ou déacylés pour produire un large éventail de différents métabolites comme la sphingosine-1-phosphate (S1P), des glucosylcéramides, de la céramide-1-phosphate et des sphingomyélines qui possèdent tous des propriétés marquées (figure 15).



**Figure 15: Différents rôles des métabolites sphingolipidiques produits à partir des céramides.**

- La sphingomyéline (SM): impliquée dans le maintien de l'intégrité des membranes et joue un rôle important dans la composition des lipoprotéines.
- La sphingosine-1-phosphate (S1P): prolifératif et anti-apoptotique;
- Le céramide-1-phosphate(C1P): prolifératif et impliqué dans l'insulinorésistance;
- Le glucosylcéramide (GlcCer): impliqué dans l'insulinorésistance.

De manière intéressante, comme les céramides, la plupart de ces métabolites a été retrouvé dans le plasma humain à des niveaux non négligeables (Hammad et al., 2010) et l'augmentation de la concentration de certains est souvent associée à des perturbations métaboliques. Par exemple, des concentrations circulantes élevées de céramides et de gangliosides (dérivés de glucosylcéramide) sont clairement associées à une perte de sensibilité

à l'insuline (Shui et al., 2011), des niveaux élevés de sphingomyéline plasmatique sont associés à une stéatose hépatique chez des patients présentant une hépatite C (Li et al., 2014a), les concentrations circulantes de S1P sont plus élevées chez l'homme avec l'exercice (Baranowski et al., 2011), mais aussi chez le patient obèse (Kowalski et al., 2013), et les concentrations plasmatiques de glucosylcéramides sont augmentées chez les patients atteints de la maladie de gaucher (Ghauharali-van der Vlugt et al., 2008). Ces quelques exemples de la littérature suggèrent donc que ces dérivés sphingolipidiques pourraient jouer un rôle important dans la régulation de nombreuses voies métaboliques et des études montrent qu'ils sont en effet impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique.

### *i) Sphingosine-1-phosphate (S1P)*

La dégradation des céramides pour donner de la S1P est initiée par des céramidases qui produisent de la sphingosine. Cette sphingosine est ensuite transformée en S1P par des sphingosines kinases (SphKs) qui catalysent la phosphorylation ATP-dépendante de la sphingosine (Le et al., 2004). Les SphKs sont une classe de kinase lipidique distincte et possèdent 5 domaines conservés au cours de l'évolution. Deux isoformes de SphK ont été caractérisés et appelés SphK1 et SphK2 (Liu et al., 2002a). Ces deux isoformes sont localisés de façon prédominante dans le cytosol, avec de petites quantités retrouvées au niveau membranaire. Les SphK1 et SphK2 ont des propriétés cinétiques, une distribution tissulaire et des expressions temporelles différentes, suggérant qu'elles exercent des fonctions cellulaires distinctes et pourraient être régulées différemment (Spiegel and Milstien, 2003). La SphK1 est exprimée principalement dans les cellules épithéliales bronchiques et les muscles lisses, alors que l'expression de la SphK2 est à peu près la même dans tous les tissus (Aarthi et al., 2011). La S1P peut agir aussi bien de manière autocrine que paracrine. Après synthèse intracellulaire, la S1P est exportée par des transporteurs de la famille ABC (Mitra et al., 2006) et se fixe sur ses récepteurs S1PR (couplés aux protéines G) présents à la surface cellulaire (Spiegel et al., 2002). Dans le plasma humain, 65% de la S1P est transportée par des lipoprotéines (en particulier par les HDL) (Okajima, 2002). Elle est véhiculée jusqu'aux cellules endothéliales dont sa liaison aux récepteurs S1PR membranaires stimule la croissance et la survie (Kimura et al., 2003). Jusqu'à présent, cinq récepteurs de la S1P (S1P<sub>1-5</sub>) ont été identifiés. Ceux-ci lient la S1P avec une haute affinité. Ils sont exprimés de façon ubiquitaire et se couplent à différentes protéines G (G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>12/13</sub>) qui régulent de nombreux signaux (Rac, Pi3-kinase, ERK, JNK...) (Spiegel and Milstien, 2003). Au niveau musculaire, c'est le récepteur S1P<sub>2</sub> qui est principalement exprimé (Spiegel and Milstien, 2003).

La S1P, qui circule chez les mammifères à des concentrations élevées (>200 nM) (Hammad et al., 2012), joue un rôle important dans le contrôle de la survie et de la croissance cellulaire (effets opposés à ceux des céramides) et les Sphks ont émergées comme des enzymes de signalisation importante. En tant que telle, les SphKs contrôlent l'équilibre entre les deux sphingolipides et servent de "rhéostat sphingolipide".

Concernant le métabolisme glucidique musculaire, l'action de la S1P reste controversée. Schématiquement, et en fonction des tissus, il a été mis en évidence que, soit la S1P contrecarrait l'action délétère des céramides sur la voie de signalisation insulinaire, soit la S1P aggravait les effets des céramides. En effet, des études *in vitro* ont montré que la S1P stimule le transport de glucose par transphosphorylation du récepteur de l'insuline (Rapizzi et al., 2009) et que l'utilisation d'activateurs de la SphK1 pour pousser le métabolisme des céramides vers la production de S1P améliore la sensibilité à l'insuline des cellules (Bruce et al., 2013). De plus, la surexpression modérée de la SphK1 chez la souris améliore la sensibilité à l'insuline dans les muscles squelettiques (Bruce et al., 2012). Pareillement, l'injection d'un adénovirus codant pour la SphK1 améliore le métabolisme du glucose chez des souris obèses et diabétiques (Ma et al., 2007).

Cependant, des souris déficientes pour la SphK1 placées sous régime riche en graisses ne semblent pas être plus résistantes à l'insuline que les animaux de type sauvage (Qi et al., 2013). De manière surprenante, une étude très récente montre qu'une production de S1P en réponse au palmitate dans les hépatocytes isolés induit une insulino résistance (Fayyaz et al., 2014). Ces derniers résultats vont dans le même sens qu'une étude plus ancienne qui montre également un effet délétère de la S1P sur la voie insulinaire dans des cellules épithéliales (Schuppel et al., 2008). Enfin, le groupe de Cowart montre que l'activation de la voie SphK1/S1P participe à la production/sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL6 en réponse au palmitate dans le muscle (Ross et al., 2013).

A partir de ces données, il apparaît que le rôle bénéfique de la S1P dans la régulation de la sensibilité à l'insuline au cours de l'obésité est encore flou, particulièrement dans les études menées *in vivo* (Fayyaz et al., 2014).

## **ii) Sphingomyéline (SM)**

La SM est le composant majeur de la membrane plasmique (20% des lipides totaux) et des organites qui en dérivent (endosomes et lysosomes). La SM, presque exclusivement présente sur le feuillet externe de la membrane plasmique, joue un rôle structural évident en garantissant le maintien de l'intégrité cellulaire (Kolesnick, 1987). En effet, la SM (avec

d'autres sphingolipides comme les glucosylcéramides) est concentrée dans des domaines membranaires spécifiques appelés radeaux lipidiques. Ces structures servent de plateformes de signalisation de par leur capacité à recruter de nombreuses protéines de signalisation (Simons and Ikonen, 1997).

La SM est aussi un constituant majeur des lipoprotéines. Sa synthèse dans le foie à partir de céramides formés *de novo* influe considérablement sur les concentrations de lipoprotéines circulantes (Li et al., 2009)

La synthèse de la SM est principalement effectuée dans la face interne de l'appareil de Golgi par la SM synthase 1 (SMS1) qui transfère un groupement phosphocholine de la phosphatidylcholine aux céramides, en libérant un diacylglycérol (Riboni et al., 1997). Un second isoforme de SMS appelé SMS2 est présent au niveau de la membrane plasmique des cellules.

De manière intéressante, la transformation des céramides en SM dans l'appareil de Golgi pourrait être une étape importante pour empêcher les céramides de s'accumuler dans le RE et d'agir négativement dans les cellules. En effet, des souris déficientes pour la SMS1 voient leur concentrations en céramides augmenter, présentent de graves anomalies de sécrétion d'insuline et développent un diabète (Yano et al., 2011a).

Cependant, les souris déficientes en SMS2 sont en bonne santé et ne présentent pas d'anomalités métaboliques apparentes. Mises sur régime hyperlipidique, ces souris ne développent pas d'obésité ni d'insulinorésistance (Mitsutake et al., 2011a).

Les quantités de SM intracellulaires sont aussi régulées par des sphingomyélinases (SMase). Six isoformes de SMases ont été identifiés (3 SMases acides et 3 SMases neutres). Ils sont localisés dans divers compartiments cellulaires comme les lysosomes, la membrane plasmique, le RE la mitochondrie et le noyau (Jenkins et al., 2009; Wu et al., 2010). Parmi les SMases, ce sont la SMase acide lysosomiale et la SMase neutre 2 (nSMase2) qui sont considérées comme les principales candidates pour la production de céramides en réponse au stress cellulaire. La nSMase2 est la nSMase la mieux caractérisée et a émergé comme un médiateur clef de la génération de céramide en réponse à un stress. La nSMase2 a été impliquée dans la réponse à plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  pour affecter plusieurs voies de signalisation impliquées dans certains cancers (Kim et al., 2008; Ito et al., 2009), développement et croissance (Stoffel et al., 2005; Stoffel et al., 2007) et réponses inflammatoires (Nikolova-Karakashian et al., 2008; Devillard et al., 2010).

Il a été montré que l'expression de la nSMase2 augmente chez des sujets intolérants au glucose (Strackowski et al., 2007a) et chez les rongeurs rendus insulino-résistants suite à un régime hyperlipidique (Murase et al., 1998; Shah et al., 2008). Une étude récente montre une augmentation de l'expression du gène de la nSMase2 chez les patients diabétiques de type 2 (Pralhada et al., 2013). En revanche, l'expression de la nSMase2 est diminuée après l'exercice (Helge et al., 2004; Dobrzyn and Gorski, 2002), conduisant à une augmentation du rapport SM/céramides.

Afin d'investiguer l'implication de la voie des sphingomyélinases dans l'insulino-résistance musculaire, le groupe de Verma et al. (2014) a traité la lignée musculaire C2C12 avec du palmitate (connu pour produire les céramides par la voie de biosynthèse *de novo*), en présence ou en non d'un inhibiteur pharmacologique de la nSMase (GW4869). Cette étude montre que l'expression des 3 isoformes nSMase est augmentée avec le palmitate et que la signalisation insulinique est altérée (diminution de la phosphorylation de la PKB/Akt en réponse à l'insuline) en présence de palmitate. Cependant, ces altérations sont inhibées en présence de l'inhibiteur de la nSMase (Verma et al., 2014). Cette étude suggère donc que la balance SM/céramide est très importante pour la sensibilité à l'insuline musculaire, même si les auteurs n'ont pas mesuré les concentrations en céramides dans les différents traitements (Verma et al., 2014).

Toutes ces études montrent que le rapport SM/céramide est très important pour garder une sensibilité à l'insuline optimale et que, aussi bien les SMS que les nSMases pourraient être des cibles intéressantes pour empêcher l'accumulation de céramides dans les cellules.

### **iii) Gangliosides**

Les gangliosides sont des glycosphingolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acide sialique (N-acétyl-neuraminique) (Uemura, 2012). Bien que découverts originalement dans le cerveau, les gangliosides sont présents dans tous les tissus et représentent près de 5% des lipides de la membrane plasmique (Hakomori, 1981). En dehors du cerveau, les gangliosides les plus représentés sont les monosialodihexosylgangliosides (GM3). La biosynthèse des gangliosides s'effectue dans l'appareil de Golgi puis ils sont exportés vers la membrane plasmique *via* les endosomes (Kolter et al., 2002). Ils sont surtout localisés sur le feuillet externe de la membrane plasmique où ils sont utilisés comme sites de reconnaissance et de fixation par les virus, bactéries et toxines (Karlsson, 1989).

Les niveaux d'expression de GM3 sont augmentés en réponse au TNF  $\alpha$ , une cytokine dont l'expression est élevée chez des patients obèses, et ont été retrouvés élevés dans le tissu adipeux d'animaux obèses (Tagami et al., 2002). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou des stratégies d'ablation génique pour inhiber les glucosylcéramides ou l'expression de la GM3 synthase ont montré que les animaux étaient protégés d'une insulino-résistance induite par un régime gras (Tagami et al., 2002; Yamashita et al., 2003).

Le mécanisme par lesquels les GM3 antagonisent la signalisation insulinique a été mis en évidence. En effet, l'addition de GM3 exogène dans des adipocytes induit la ségrégation du récepteur de l'insuline dans des domaines non-cavéolaires riches en gangliosides, empêchant ainsi la phosphorylation des résidus tyrosine du récepteur en réponse à l'hormone (Yates and Rampersaud, 1998; Kabayama et al., 2007).

Collectivement, ces résultats montrent que les gangliosides ont une action négative sur la sensibilité à l'insuline des cellules et que le ciblage des GM3 pourrait être une stratégie thérapeutique pour le traitement de l'insulinorésistance.

#### *iv) Céramide-1-phosphate*

Un métabolite cellulaire majeur dérivé des céramides est le céramide-1-phosphate (C1P) qui est formé directement par la phosphorylation des céramides *via* la céramide kinase (CERK). Beaucoup d'études suggèrent que la C1P régule la prolifération cellulaire et l'apoptose (Gomez-Munoz, 1998; Gomez-Munoz, 2004). Par exemple, la C1P stimule la prolifération des myoblastes C2C12 (Gangoiti et al., 2012). Le groupe de Chalfant a aussi impliqué la C1P dans les réponses inflammatoires (Chalfant and Spiegel, 2005; Lamour and Chalfant, 2005). De plus, la C1P joue un rôle dans les phénomènes de phagocytose (Hinkovska-Galcheva et al., 1998; Hinkovska-Galcheva et al., 2005).

Récemment, le rôle de la C1P dans l'insulinorésistance a été mis en évidence. En effet, une étude a montré que la suppression du gène codant pour CERK améliorait la sensibilité de souris nourries avec un régime hyper-lipidique comparé à des animaux contrôles (Mitsutake et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que, dans des conditions physiopathologiques (régime gras), la déficience de CERK et l'absence concomitante de production de C1P résultait en une réduction de l'infiltration macrophagique normalement observée dans les adipocytes dans des conditions d'obésité et de diabète (Mitsutake et al., 2012).



## ***Objectifs de la thèse***

Bien que de nombreuses questions concernant les mécanismes d'action des céramides sur la voie insulinique dans les cellules musculaires ont été adressées ces dernières années (voir introduction), d'autres restent toujours en suspens et méritaient toute notre attention.

En effet, dans la littérature, certaines données suggèrent que les céramides agissent dans des lignées musculaires d'origine différente *via* deux mécanismes d'action différents sur la voie insulinique. Il était donc fondamental dans un but thérapeutique de bien comprendre pourquoi les céramides adoptent l'une ou l'autre voie.

Est-ce que la structure lipidique ou protéique de la membrane plasmique des myotubes peut expliquer les modes d'action différentiels des céramides? Cette question découle des résultats d'une étude de l'équipe qui a montré que l'abondance des membranes en cavéoles au niveau de la membrane plasmique, joue un rôle clef pour déterminer la voie par lesquelles les céramides agissent sur la voie insulinique (Blouin et al., 2010a).

L'objectif de la première étude visait donc à vérifier cette hypothèse dans nos modèles de lignées musculaires C2C12 et L6. De plus, nous avons aussi cherché à découvrir quel mécanisme prédominait dans des cellules musculaires humaines (article 1).

L'objectif principal de la seconde étude consistait à essayer d'empêcher les céramides d'agir négativement sur la voie de signalisation insulinique dans les cellules musculaires en limitant leur accumulation dans des conditions lipotoxiques (excès lipidique). Il n'était pas réaliste d'inhiber complètement leur voie de biosynthèse par l'utilisation d'inhibiteurs comme la myriocine (qui bloque la première enzyme de la voie de biosynthèse des céramides), les céramides constituant le squelette de sphingolipides, et jouant un rôle structural membranaire crucial. Nous avons donc choisi d'étudier comment convertir les céramides en SM pour différentes raisons expliquées dans l'article 2. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à la régulation du transport des céramides du RE où ils sont synthétisés vers le Golgi où ils sont transformés en sphingomyélines dans des conditions lipotoxiques. Cette étude est un travail en cours qui sera soumis prochainement pour publication (article 2).

## **RESULTATS**

# **I. Caractérisation de l'action inhibitrice des céramides sur la signalisation insulinique dans différents modèles musculaires: une approche mécanistique**

Rana Mahfouz, Rhéa Khoury, Agnieszka Blachnio-Zabielsk, Sophie Turban, Nicolas Loiseau, Christopher Lipina, Clare Stretton, Pascal Ferré, Fabienne Foufelle, Harinder S. Hundal et Eric Hajdich.

*PLOS ONE (2014).*

## **A- Introduction**

Des études suggèrent que les céramides sont d'importants contributeurs de la lipotoxicité, puisque l'inhibition des premières étapes de la voie de biosynthèse des sphingolipides présente des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline dans des modèles obèses et diabétiques de rongeurs.

Deux lignées musculaires squelettiques qui ont été utilisées pour étudier les effets délétères des céramides sur l'action de l'insuline, la lignée musculaire de rat L6 et la lignée musculaire de souris C2C12. Ces deux lignées musculaires ont été utilisées abondamment dans la littérature pour l'étude du métabolisme glucidique et lipidique musculaire.

Les myotubes L6 et C2C12 sont des cellules murines dérivées de cellules satellites musculaires de rat ou de souris respectivement, et leur comportement correspond à celui de leur lignée progénitrice. En effet, les myoblastes L6 et C2C12 se différencient spontanément en culture après élimination du sérum en formant des myotubes qui produisent avec succès des structures sarcomériques. Les myotubes expriment plusieurs protéines spécifiques du muscle squelettique comme le transporteur de glucose GLUT4. Même si les myotubes L6 expriment des quantités plus importantes du transporteur de glucose GLUT4 (cependant moindre que ce qui est trouvé dans des « vrais » myotubes), les deux lignées possèdent un transport de glucose insulino-stimulé.

Dans la lignée musculaire L6, les céramides inhibent la voie de signalisation insulinique en activant la PKC $\delta$ , qui interagit avec la PKB/Akt et phosphoryle le résidu thréonine 34 situé dans le domaine PH de la PKB/Akt. Suite à cette interaction, la PKB/Akt est séquestrée dans des domaines spécialisés de la membrane plasmique enrichis en cavéolines (cavéoles),

empêchant ainsi son recrutement dans les régions enrichies en PIP3 où la PKB/Akt est normalement activée en réponse à l'insuline.

En revanche, dans les myotubes C2C12, la PKB/Akt est réprimée par un autre mécanisme dépendant de l'activité de la protéine phosphatase 2A (PP2A), cette dernière étant activée par les céramides et déphosphorylant les résidus sérine et thréonine normalement phosphorylés en réponse à l'insuline.

Etonnamment, aucune donnée n'a été publiée sur le mécanisme d'action des céramides dans de « vrais » cellules musculaires.

Le but de cette étude a donc été double :

Premièrement, nous nous sommes demandés pourquoi dans la lignée musculaire L6, les céramides inhibent la voie insulinaire *via* la PKC $\delta$ , alors que dans la lignée musculaire C2C12, ils agissent *via* l'activation de la PP2A.

Deuxièmement, nous avons recherché quel mécanisme dominait dans des cellules musculaires humaines. Nous ne possédions pas d'information concernant le mécanisme fonctionnel responsable de l'action délétère des céramides sur la sensibilité à l'insuline le muscle squelettique humain. Par conséquent, nous avons exploré l'implication potentielle des voies «PKC $\zeta$  » et « PP2A » dans des cellules musculaires humaines mises en culture primaire.

## **B- Résultats**

Nos résultats indiquent que le mécanisme par lequel ces céramides agissent pour réprimer la voie insulinaire est lié à l'abondance des myotubes en domaines riches en cavéolines présents au niveau de la membrane plasmique des cellules. Nous montrons que ces domaines sont très abondants et enrichis en céramides dans les cellules L6 comparé aux cellules C2C12, ce qui est consistant avec le rôle important qu'ils jouent dans l'inhibition de la PKB/Akt *via* l'activation des PKCs atypiques par les céramides dans les myotubes L6. Dans les cellules C2C12 cependant, une voie dépendante de la PP2A prédomine, car peu de céramides sont présents au niveau de la membrane plasmique ces cellules.

De plus, nous montrons pour la première fois que les céramides, produites en réponse à un excès de palmitate, inhibent l'activation de la PKB/Akt par l'insuline *via* l'activation des PKCs atypiques dans les myotubes humains en culture.

Nous avons confirmé des résultats dans des myotubes provenant de patients diabétiques. Nous montrons qu'en empêchant l'activation des PKCs atypiques par les céramides, nous empêchons ces dernières d'inhiber la voie de signalisation insulinaire.

## **C- Conclusion**

Notre étude met en évidence des différences mécanistiques clefs par lesquelles les céramides inhibent la signalisation insulinique dans les myotubes L6 et C2C12. Nos résultats montrent l'importance de la composition/structure membranaire dans la détermination du mode d'action des céramides (voie PKCs atypiques ou PP2A) pour perturber la réponse insulinique. De plus, pour la première fois, nous mettons en évidence que les céramides privilégient la voie PKCs atypiques pour leur mode d'action au niveau humain.

Ces résultats montrent donc le rôle clef de la structure et de la composition membranaire des cellules pour déterminer l'efficacité et/ou la prédominance des mécanismes d'action des céramides sur la signalisation insulinique au niveau musculaire.

Il faudra donc être prudent pour interpréter et comparer les données provenant de ces différentes lignées musculaires, particulièrement quand le rôle de dérivés lipidiques comme les céramides dans la modulation de la sensibilité insulinique est exploré.



# Characterising the Inhibitory Actions of Ceramide upon Insulin Signaling in Different Skeletal Muscle Cell Models: A Mechanistic Insight

Rana Mahfouz<sup>1,2,3</sup>, Rhéa Khoury<sup>1,2,3</sup>, Agnieszka Blachnio-Zabielska<sup>4</sup>, Sophie Turban<sup>5</sup>, Nicolas Loiseau<sup>6</sup>, Christopher Lipina<sup>5</sup>, Clare Stretton<sup>5</sup>, Olivier Bourron<sup>1,2,3,7</sup>, Pascal Ferré<sup>1,2,3</sup>, Fabienne Fougelle<sup>1,2,3</sup>, Harinder S. Hundal<sup>5</sup>, Eric Hajdouch<sup>1,2,3\*</sup>

**1** INSERM, UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France, **2** Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR-S 1138, Paris, France, **3** Université Paris Descartes, UMR-S 1138, Paris, France, **4** Department of Physiology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland, **5** Division of Cell Signalling and Immunology, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, United Kingdom, **6** INRA, UMR1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France, **7** Département de Diabétologie et Maladies métaboliques, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

## Abstract

Ceramides are known to promote insulin resistance in a number of metabolically important tissues including skeletal muscle, the predominant site of insulin-stimulated glucose disposal. Depending on cell type, these lipid intermediates have been shown to inhibit protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the metabolic actions of insulin, via two distinct pathways: one involving the action of atypical protein kinase C (aPKC) isoforms, and the second dependent on protein phosphatase-2A (PP2A). The main aim of this study was to explore the mechanisms by which ceramide inhibits PKB/Akt in three different skeletal muscle-derived cell culture models; rat L6 myotubes, mouse C2C12 myotubes and primary human skeletal muscle cells. Our findings indicate that the mechanism by which ceramide acts to repress PKB/Akt is related to the myocellular abundance of caveolin-enriched domains (CEM) present at the plasma membrane. Here, we show that ceramide-enriched-CEMs are markedly more abundant in L6 myotubes compared to C2C12 myotubes, consistent with their previously reported role in coordinating aPKC-directed repression of PKB/Akt in L6 muscle cells. In contrast, a PP2A-dependent pathway predominantly mediates ceramide-induced inhibition of PKB/Akt in C2C12 myotubes. In addition, we demonstrate for the first time that ceramide engages an aPKC-dependent pathway to suppress insulin-induced PKB/Akt activation in palmitate-treated cultured human muscle cells as well as in muscle cells from diabetic patients. Collectively, this work identifies key mechanistic differences, which may be linked to variations in plasma membrane composition, underlying the insulin-desensitising effects of ceramide in different skeletal muscle cell models that are extensively used in signal transduction and metabolic studies.

**Citation:** Mahfouz R, Khoury R, Blachnio-Zabielska A, Turban S, Loiseau N, et al. (2014) Characterising the Inhibitory Actions of Ceramide upon Insulin Signaling in Different Skeletal Muscle Cell Models: A Mechanistic Insight. PLoS ONE 9(7): e101865. doi:10.1371/journal.pone.0101865

**Editor:** Cedric Moro, INSERM/UMR 1048, France

**Received:** March 21, 2014; **Accepted:** June 12, 2014; **Published:** July 24, 2014

**Copyright:** © 2014 Mahfouz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by INSERM, the Société Francophone du Diabète (ANTADIR grant), from an Agence Nationale de la Recherche (ANR) project (ANR 11 BSV1 03101-Crisalis), and from the Fondation pour Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20140329504). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: eric.hajdouch@crc.jussieu.fr

## Introduction

Once bound to its receptor, insulin stimulates a signalling network that functions to regulate whole-body glucose homeostasis by coordinating numerous physiological processes. Defects in the activation of insulin-induced signalling cascades are often associated with insulin resistance, a characteristic feature of obesity and type 2 diabetes [1]. The mechanisms by which insulin resistance develops are not yet fully understood but recent work has shown that forcing cells to accumulate fatty acids beyond their storage capacity may lead to insulin desensitisation through the generation of toxic lipid intermediates such as ceramide [2,3].

Skeletal muscle is the major tissue responsible for insulin-stimulated glucose disposal and therefore considered as a primary

target in the onset of insulin resistance. Various studies have suggested that ectopic accumulation of ceramide in response to oversupply of saturated fatty acids including palmitate may underlie the development of insulin resistance in this tissue [4–6].

Indeed, we and others have demonstrated that ceramide can impair insulin action through inhibition of protein kinase B (PKB/Akt), a key signal transduction intermediate that plays a pivotal role in coordinating the insulin-dependent uptake and utilization of glucose [7,8]. Two skeletal muscle cell lines that have been extensively used to study the deleterious effects of ceramide upon insulin action are rat L6 and mouse C2C12 muscle cells. In differentiated rat L6 myotubes, treatment with palmitate or exogenous ceramide leads to the activation of the atypical protein kinase C isoform PKC $\zeta$  which in turn directly interacts with and

phosphorylates the pleckstrin homolog (PH) domain of PKB/Akt at Thr34. As a result of this interaction, PKB/Akt becomes sequestered into specialized domains of the plasma membrane known as caveolin-enriched microdomains (CEM) thereby preventing its recruitment to PIP3-enriched regions where it is normally activated in response to insulin [9–11]. In contrast, whilst exposure of C2C12 myotubes to palmitate has also been shown to result in the activation of aPKC $\zeta$ , PKB/Akt becomes repressed primarily through its dephosphorylation by protein phosphatase 2A (PP2A) [12].

In this study, we set out to explore this differential mode of inhibition by ceramide upon insulin signalling in L6 and C2C12 myotubes. Importantly, we previously reported that in cells which lack CEM (e.g. fibroblasts), ceramide does not inhibit PKB/Akt through the ‘PKC $\zeta$ -CEM’ pathway, but rather through activation of PP2A [11]. This is in contrast to cells with abundant CEM (e.g. 3T3-L1 adipocytes) wherein ceramide acts to repress PKB/Akt via the PKC $\zeta$ -CEM pathway [11]. We therefore hypothesised that variations in CEM content between these different muscle cell lines may account for the distinct signalling pathways utilised by ceramide to impair insulin action. Herein, we demonstrate that whilst ceramide impairs insulin-stimulated PKB/Akt activation *via* the ‘PKC $\zeta$ -CEM’ pathway in L6 myotubes, this same lipid intermediate does so *via* a PP2A-dependent mechanism in C2C12 myotubes which exhibit a lower CEM content relative to L6 myotubes.

In addition, little is known about the functional mechanism(s) responsible for conveying the insulin desensitising effects of ceramide in human skeletal muscle. Therefore, we explored the potential involvement of the ‘PKC $\zeta$ -CEM’ and PP2A pathways in primary cultured human muscle cells, which represent a good model for studying human skeletal muscle function [13] and can be modulated *ex vivo* [13]. We show that similar to L6 myotubes, it is the ‘PKC $\zeta$ -CEM’ pathway which predominantly mediates the repressive effects of ceramide upon PKB/Akt in human muscle cells.

## Methods

### Materials

All reagent-grade chemicals, insulin, palmitate, and BSA were purchased from Sigma-Aldrich. C<sub>2</sub>-ceramide was obtained from Cayman Chemical Company. Complete protein phosphatase inhibitor tablets were obtained from Boehringer-Roche Diagnostics. Antibodies against native PKB/Akt, Ser473-PKB/Akt and <sup>21</sup>/Ser GSK3 $\alpha$ / $\beta$  were from Cell Signalling (New England Biolabs), caveolin-3, PKC $\zeta$ , PP2A and hemagglutinin from Santa Cruz Biotechnology and  $\beta$ -actin from Sigma-Aldrich. Horseradish peroxidase anti-rabbit, -mouse and -sheep/goat IgGs were from Jackson ImmunoResearch Laboratories and the enhanced chemiluminescent substrate was from Pierce-Perbio Biotechnology.

### Cell culture

L6 muscle cells were grown as a monolayer as described previously [14] to the stage of myotubes in  $\alpha$ -minimum essential medium containing 2% fetal calf serum and 1% antimicrobial/antibiotic solution. C2C12 myoblasts were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) containing 10%(v/v) fetal bovine serum. For differentiation into myotubes, the myoblasts were grown to confluence and the media were replaced with DMEM containing 2% horse serum. Both cell lines were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% air. Myotubes were used for experiments 4 days following differentiation.

### Human skeletal muscle cells

Biopsies from healthy adult lean volunteers were obtained in the context of approved preclinical and clinical trials [15], and *via* the Tissue Bank for Research (Myobank) of the French Association against Myopathies (AFM), in agreement with the French bioethical law (law no 94-654 of 29 July 1994, modified 22 January 2002) on informed consent. Muscle samples from three adult type 2 diabetic patients were obtained from healthy tissue after leg amputation. Donors had no clinical signs of muscular disease and sampled tissues had no bacterial contamination. No clinical and biological infection has been observed (ultra-sensitive C reactive protein at 6.6+/-2.6 mg/L). At baseline, HbA1c and fasting glycaemia of type 2 diabetic patients were respectively 7.9+/-0.31% and 7.59+/-0.44 mmol/L. Fresh muscle samples were minced and enzymatically dissociated with collagenase. Myoblasts were purified, grown and differentiated as myotubes as previously described [16].

### Preparation of whole cell lysates

Cells were lysed following experimental manipulation (see figure legends) in an appropriate volume of lysis buffer [14].

### Preparation of detergent-resistant membranes (DRM)

DRM were prepared as described previously [10]. Cells were homogenized into 25 mM MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid), pH 6.0, 150 mM NaCl, 1% (w/v) Triton X-100, complete inhibitor tablet and lysate ran on a sucrose gradient. The gradient was centrifuged at 120,000 g for 20 h at 4°C. DRM fractions were then collected and frozen at -20°C until required.

### DRM-containing ceramide quantification

700  $\mu$ L of each DRM fraction were freeze-dried and subsequently extracted once with chloroform/methanol (C/M) (2:1), once with C/M (1:1) and once with C/M (1:2). The combined C/M extracts were freeze dried and solubilized in 2 mL of C/M (1:1) with 3M of potassium hydroxide. The solution is incubated overnight at 50°C. 800  $\mu$ L of distilled water (W) is added. The solution is neutralized using hydrochloric acid 1N. Organic extract was washed twice with C/M/W (3:48:47), dried under nitrogen and dissolved in 50  $\mu$ L of C/M (1:1) before analysis. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) analyses were performed with a multistep development. A first development was realized with the solvent system Hexane/diethyl ether/acetic acid (30:15:0.5) until a developing distance of 80 mm (from the lower edge of the plate). The second and third development was realized with the solvent system C/M/W (40:10:1) until the respective developing distance of 30 mm and 50 mm. The fourth development was realized with the solvent system C/M/acetic acid (47:2:0.5) until a developing distance of 80 mm. And the last development was realized with the solvent system Hexane/diethyl ether/acetic acid (30:15:0.5) until a developing distance of 80 mm. After each development the plate was dried 5 minutes. Bands were detected after immersion in a charring solution and drying at 250°C during 1 minute. Quantification was realized by densitometry with CAMAG TLC scanner 4 and winCATS software in absorption mode at 560 nm using a tungsten lamp.

### Analysis of sphingolipid content

Sphingolipids were extracted and assessed as described previously [17].

### Glucose transport

Human myotubes were washed rapidly with HEPES-buffered saline (HBS; 20 mM HEPES-Na (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>), and glucose uptake was assayed by incubating cells with 10  $\mu$ M 2-deoxy-[3H]-D-glucose (1  $\mu$ Ci/ml, 26.2 Ci/mmol) for 15 min in HBS. Carrier-mediated uptake was determined by quantitating cell-associated radioactivity in the presence of 10 mM cytochalasin B (an inhibitor of facilitative glucose transport). Radioactive medium was aspirated rapidly followed by three cell washes in ice-cold isotonic saline solution (0.9% NaCl, w/v) prior to lysis in 0.05 M NaOH [18]. Cell-associated radioactivity was determined by liquid scintillation counting and protein determined by the method of Bradford [19].

### Immunoblotting

Cell lysates were subjected to SDS/PAGE and immunoblotted as previously reported [14]. Nitrocellulose membranes were probed with various antibodies as described in the figure legends. Detection of primary antibodies were performed using appropriate peroxidase-conjugated IgGs and protein signals were visualized using enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific Pierce) by exposure to Kodak autoradiographic film.

### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using a Student's *t* test. Data were considered statistically significant at *p* values <0.05 and notified by \*.

### Results

In an initial attempt to identify factors underpinning the distinct mechanisms involved in mediating the repressive effects of ceramide upon PKB/Akt in L6 and C2C12 myotubes through PKC $\zeta$  and PP2A respectively, we hypothesised that differences in CEM abundance and/or composition may account for these differential modes of action. This was based on our previous published work demonstrating the key role that CEM abundance plays in determining ceramide-induced pathways leading to PKB/Akt inhibition in non-muscle cell types [11]. We selected caveolin-3 as a CEM marker since this protein is the predominant caveolin isoform expressed in muscle cells and is known to play a crucial role in maintaining CEM structure [20]. Immunoblot analysis of caveolin-3 revealed no significant difference in total caveolin-3 protein content in whole cell lysates of fully differentiated L6 and C2C12 muscle cells (around 3 ng caveolin-3 per  $\mu$ g total protein lysate), as shown in figure 1A. We next examined caveolin-3 protein abundance in CEM structures by isolating detergent resistant membranes (DRM) on discontinuous sucrose density gradients [10], and immunoblotting the resulting DRM fractions for caveolin-3. Interestingly, Figure 1B shows that caveolin-3 protein expression in DRM (fractions 3 to 5) obtained from L6 myotubes was approximately 3-fold greater compared to those isolated from C2C12 myotubes. This suggests higher CEM abundance in L6 versus C2C12 plasma membranes. Because ceramide is known to accumulate within CEMs [21], we assessed whether ceramide concentration would correlate with CEM caveolin-3 content in DRM fractions isolated from these two muscle cell lines. To investigate this, we treated L6 and C2C12 myotubes with 100  $\mu$ M short-chain C2-ceramide for two hours prior to isolation of DRM fractions that were subsequently used for quantitative determination of ceramide content. Figure 1C shows that ceramide accumulates in DRM fractions 3 to 6 of both cell lines but to a far lesser extent (10 times less in terms of

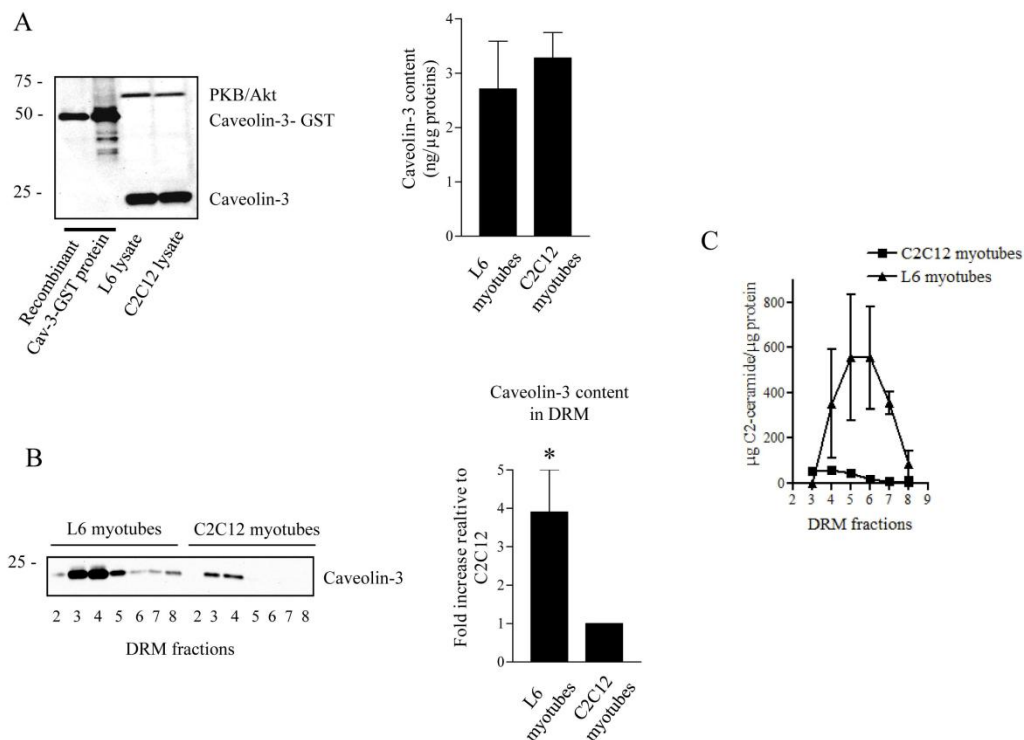
abundance) in C2C12 compared to L6 myotubes. Therefore, lower CEM abundance in C2C12 myotubes may account for the reduced capacity of these cells to retain ceramide in active membrane microdomains. This may also help to explain why inhibition of PKB/Akt by ceramide occurs outside these membrane domains and is mainly dependent upon PP2A activation in C2C12 myotubes [8–10].

To test this possibility, we examined whether the “PKC $\zeta$ -CEM” pathway which inhibits PKB/Akt in L6 myotubes may also be functional in C2C12 myotubes. As predicted based on comparative CEM analysis, whilst C2-ceramide promotes the recruitment of PKC $\zeta$  into L6 CEM domains, no PKC $\zeta$  was detected in CEMs (fractions 3–5) isolated from C2C12 myotubes challenged with C2-ceramide (figure 2A). Furthermore, PP2A was not detected in ceramide-treated CEM from either muscle cell lines (figure 2A) in accordance with previous work showing that ceramide-activated PP2A acts outside the CEM environment [11].

Having established that PKC $\zeta$  is not recruited to CEM in response to ceramide in C2C12 myotubes, we next assessed whether the presence of CEM was dispensable for ceramide to repress PKB/Akt in these cells. Figure 2B shows that in L6 myotubes, ceramide-mediated inhibition of PKB/AktSer473 phosphorylation in response to insulin was prevented by methyl  $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), a cholesterol depleting agent that has been shown to disrupt CEM integrity without affecting insulin signalling capacity [10]. This demonstrates the importance of CEM in supporting ceramide action in these cells. Moreover, we used either okadaic acid (OKA), a potent inhibitor of protein phosphatase 2A (PP2A), and the pharmacological Protein Kinase C (PKC) inhibitor Ro 31.8220 to determine which ceramide-activated pathway (aPKC $\zeta$  or PP2A) mediates the repressive effect of ceramide on PKB/Akt. The bisindolomaleimide Ro 31.8220 potentially inhibits conventional and novel PKCs in an ATP-competitive manner with IC<sub>50</sub> values in the submicromolar range, as well as atypical PKCs in the micromolar range [9]. Figure 2C shows that whilst applying OKA (500 nM) displays no significant effect, Ro 31.8220 (at 5  $\mu$ M, optimal final concentration to counteract the activation of aPKC $\zeta$  by ceramide in L6 myotubes, figure S1A) is able to largely prevent the negative action of ceramide upon the insulin-induced phosphorylation of PKB/Akt, thereby confirming the importance of the “CEM- PKC $\zeta$ ” pathway in mediating this insulin desensitising effect in L6 myotubes.

In contrast, in C2C12 myotubes, treatment with M $\beta$ CD did not prevent the repressive action of either palmitate (ceramide precursor) or C2-ceramide upon insulin-stimulated PKB/Akt Ser473 phosphorylation, or upon phosphorylation of one of its physiological downstream targets, GSK3 $\alpha/\beta$  (figure 2D). The lack of CEM involvement in ceramide action in C2C12 myotubes was further confirmed by overexpressing an inactive dominant negative PKC $\zeta$  mutant (KD- PKC $\zeta$ ) in these cells. Figure 2D shows that, in contrast to what has previously been reported in L6 myotubes [9], prevention of PKC $\zeta$  activation does not counteract either palmitate nor ceramide mediated repression of insulin-induced PKB/Akt and GSK3 $\alpha/\beta$  phosphorylation. Furthermore, inhibition of PP2A using OKA (at 500nM, optimal final concentration to counteract the activation of PP2A by ceramide in C2C12 myotubes, figure S1B) was found to completely prevent palmitate and ceramide mediated suppression of PKB/Akt and GSK3 $\alpha/\beta$  phosphorylation in insulin treated C2C12 myotubes (figure 2D). Together, these observations suggest that, depending on cellular CEM abundance, fatty acid overload can inhibit insulin induced PKB signalling through at least one of two distinct mechanisms.





**Figure 1. Levels of caveolin expression and ceramide content in both L6 and C2C12 myotubes.** A. 15 μg of L6 and C2C12 lysates were immunoblotted alongside 65 ng and 130 ng of recombinant caveolin-3-GST (cav-3-GST) protein with an antibody against caveolin-3 (left panel). Bands were quantified and compared to known quantities of recombinant cav-3 proteins. Results were expressed as ng of cav-3 protein per μg of L6 or C2C12 protein lysate (right panel). B. L6 and C2C12 myotubes were solubilized in 1% Triton X-100 at 4°C and fractionated on sucrose gradients to isolate detergent resistant membranes (DRM) as described in the Methods section. Resulting fractions were collected from top to bottom of the gradient. Equal amounts of protein (1 μg) from fractions 2 to 8 of the sucrose gradient were then immunoblotted using an anti-caveolin-3 antibody. Bands were quantified and caveolin-3 content in L6 cells was expressed as fold increase relative to caveolin-3 content in C2C12 cells. \* Significant change  $p < 0.05$  relative to C2C12 cells. These are representative of at least three independent experiments. C. Total ceramide content was quantified in DRM-containing fractions (3–8 of the sucrose gradient) from both L6 and C2C12 myotubes. These are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0101865.g001

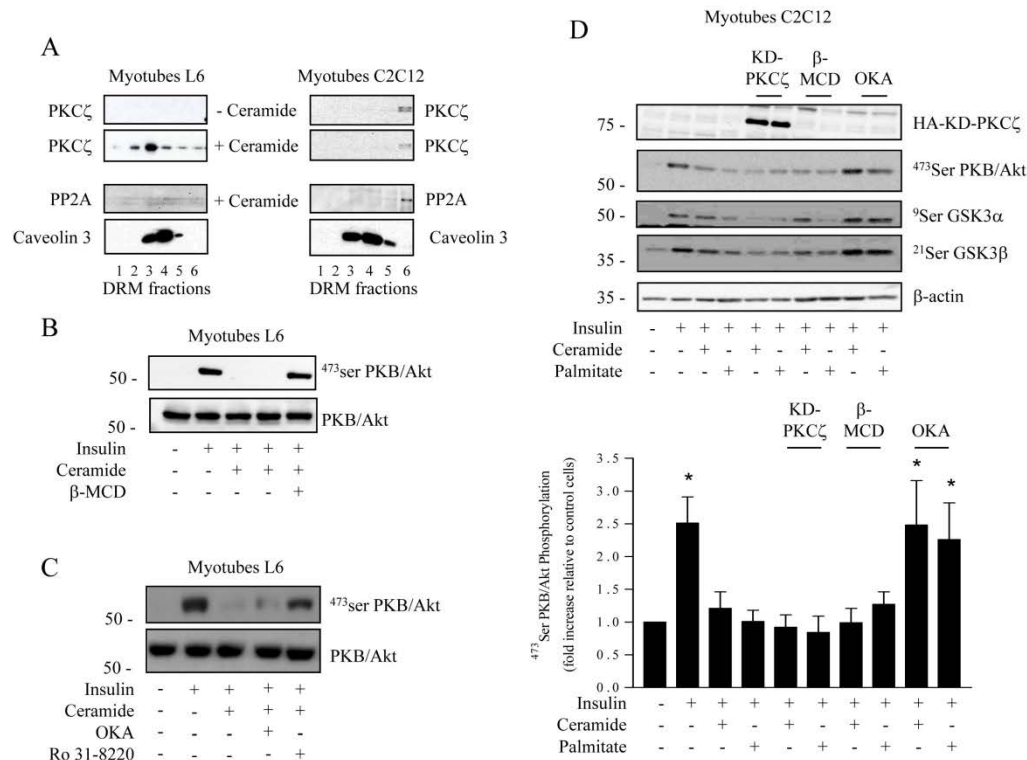
We next explored which of these mechanisms is likely to predominate in human muscle cells.

To investigate this, we used primary cultures of muscle cells derived from human biopsies. These cells have been shown to differentiate into myotubes in culture and are insulin responsive [16]. First, we wanted to establish whether our primary human muscle cells responded to palmitate treatment through assessing their ability to generate ceramide. Figure 3A shows that incubation of cultured human myotubes with 0.75 mM palmitate for 24 h led to significant increases in the cellular content of three distinct ceramide species (i.e. C16-, C18-, and C20 ceramides). Importantly, the ability of palmitate to promote these elevations in intracellular ceramide was attenuated in the presence of myriocin, a pharmacological inhibitor of the enzyme serine palmitoyl transferase (SPT) which catalyses the initial rate limiting step of *de novo* ceramide synthesis [22].

Subsequently, we assessed whether endogenous ceramide production from palmitate would impair insulin action in human

muscle cells. Figure 3B shows that prolonged (24 h) incubation of human myotubes with palmitate completely abrogated insulin-induced PKB/Akt Ser473 phosphorylation. However, when human myotubes were pre-incubated with myriocin, the insulin desensitising effect of palmitate was completely prevented, thereby highlighting the important role that ceramide accumulation plays in mediating palmitate induced insulin resistance in human muscle cells (figure 3B).

Next, we explored the mechanism by which ceramide inhibits insulin signalling in human muscle cells. To do this, we treated human myotubes with C2-ceramide for 2 h prior isolating CEM domains. As observed in L6 myotubes (figure 2A), C2-ceramide treatment induced recruitment of PKCζ into CEM domains of human myotubes (figure 4A). Then, to determine whether the ceramide-activated PKCζ pathway was involved in repressing PKB/Akt activity in human muscle cells, we suppressed ceramide induced activation of PKCζ using either Ro 31.8220 (5 μM), or by overexpressing the inactive kinase-dead (KD)-PKCζ mutant in



**Figure 2. Mechanism of ceramide action on the insulin signalling pathway in both L6 and C2C12 myotubes.** A. L6 and C2C12 myotubes were treated with 100  $\mu$ M C2-ceramide for 2 h before isolation of DRMs. Equal amounts of protein (1  $\mu$ g) of each fraction were then immunoblotted for the presence of PKC $\zeta$ , PP2A and caveolin-3. These are representative immunoblots from three independent experiments. B. L6 myotubes were pre-incubated with 100  $\mu$ M C2-ceramide for 2 h and with 5 mM M $\beta$ CD for the last 30 min. Cells were then stimulated with 100 nM insulin for 10 min before being lysed and immunoblotted using either a phospho-specific antibody directed against Ser<sup>473</sup>PKB/Akt or a pan PKB antibody. C. Control C2C12 myotubes or KD-PKC $\zeta$ -infected C2C12 myotubes were incubated with 100  $\mu$ M C2-ceramide for 2 h or with 0.75 mM palmitate for 16 h. Control C2C12 myotubes were then treated with 500 nM okadaic acid (OKA) or with 5 mM M $\beta$ CD the last 30 min. All cells were treated with 100 nM insulin for the last 10 min before being lysed. Cell lysates were immunoblotted with antibodies against native PKB/Akt, Ser<sup>473</sup>PKB/Akt, Ser<sup>21/9</sup>GSK3  $\alpha/\beta$ ,  $\beta$ -actin and hemagglutinin (HA). Scanning densitometry was performed to quantify changes in Ser<sup>473</sup>PKB/Akt abundance in cell lysates. Bars represent mean  $\pm$  SEM. \* Significant change  $p < 0.05$  relative to the untreated control. Blots shown represent at least three separate experiments. doi:10.1371/journal.pone.0101865.g002

these cells. Figure 4B shows that application of Ro 31.8220 or expression of the KD- PKC $\zeta$  mutant were able to prevent the ability of palmitate to reduce insulin-stimulated phosphorylation of PKB/Akt in human cells. In contrast, the PP2A inhibitor okadaic acid did not counteract the repressive action of palmitate towards PKB/Akt (figure 4B). In accordance with its ability to induce PKB/Akt activation, insulin stimulated glucose uptake by over 2-fold in control human myotubes (figure 4C). Importantly, whilst palmitate provision led to a profound reduction in insulin-induced glucose transport, this inhibition was completely prevented in human muscle cells cotreated with Ro 31.8220 (figure 4C). These findings indicate that, in human muscle cells, ceramide acts to impair PKB/Akt predominantly through activation of the PKC $\zeta$  pathway.

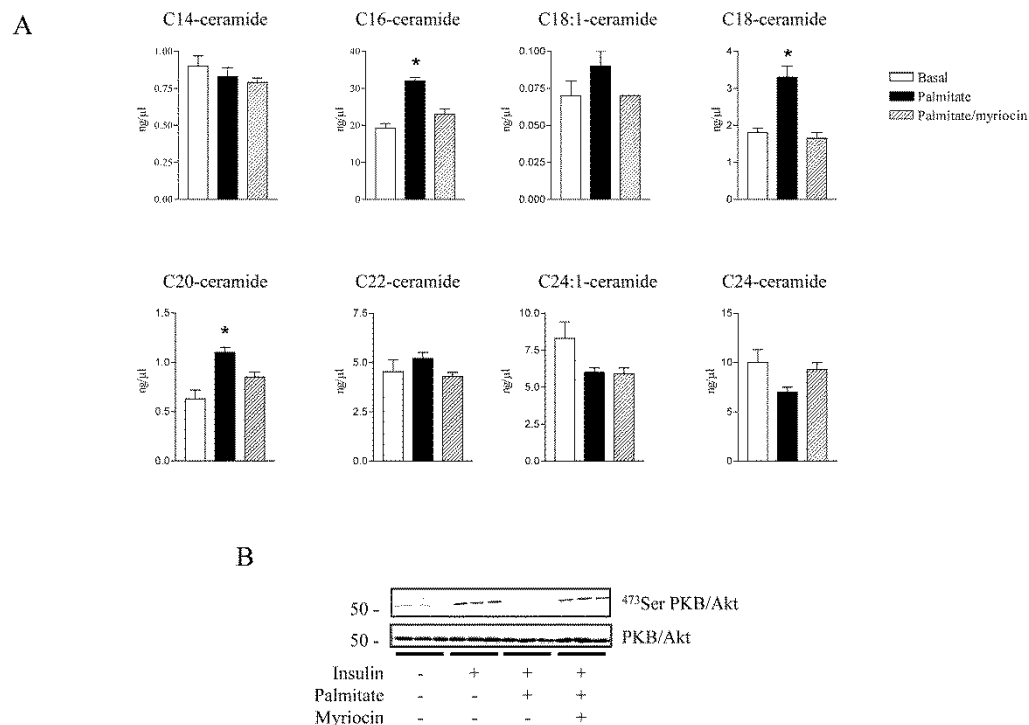
Several studies have previously demonstrated that myotubes derived from type 2 diabetic patients conserve important characteristics of the diabetic phenotype [23–25]. For example,

insulin stimulated PKB/Akt phosphorylation in cultured human diabetic myotubes is reduced compared to that observed in non-diabetic human myotubes (figure 5A). Interestingly, pre-incubation with Ro 31.8220, but not OKA, markedly improved insulin responsiveness in diabetic myotubes (figure 5B). In contrast, neither Ro 31.8220 nor OKA significantly altered insulin stimulated PKB/Akt phosphorylation in human control myotubes (figure 5C).

Collectively these observations indicate that it is the PKC $\zeta$  pathway which prevails in conveying the inhibition of PKB/Akt signalling by excess of lipids in the context of type 2 diabetes.

## Discussion

The findings presented in the current study indicate that the inhibitory effects of ceramide on insulin-induced PKB/Akt signalling can be mediated through two distinct mechanisms



**Figure 3. Effect of Palmitate on ceramide production and insulin sensitivity in human muscle cells.** Human myotubes were incubated with 0.75 mM palmitate for 48 h in the presence or absence of 10  $\mu$ M myriocin. A. Following this incubation, muscle cells were harvested in ice-cold PBS and lipids extracted to assess ceramide species content as described in the Methods section. Bars represent mean  $\pm$  SEM from 3 separate experiments and \* denote a significant difference from the untreated control values ( $P < 0.05$ ). B. Cells were then stimulated with 100 nM insulin for the last 10 min before being lysed and immunoblotted using either a phospho-specific antibody directed against Ser<sup>473</sup>PKB/Akt or a pan PKB antibody.

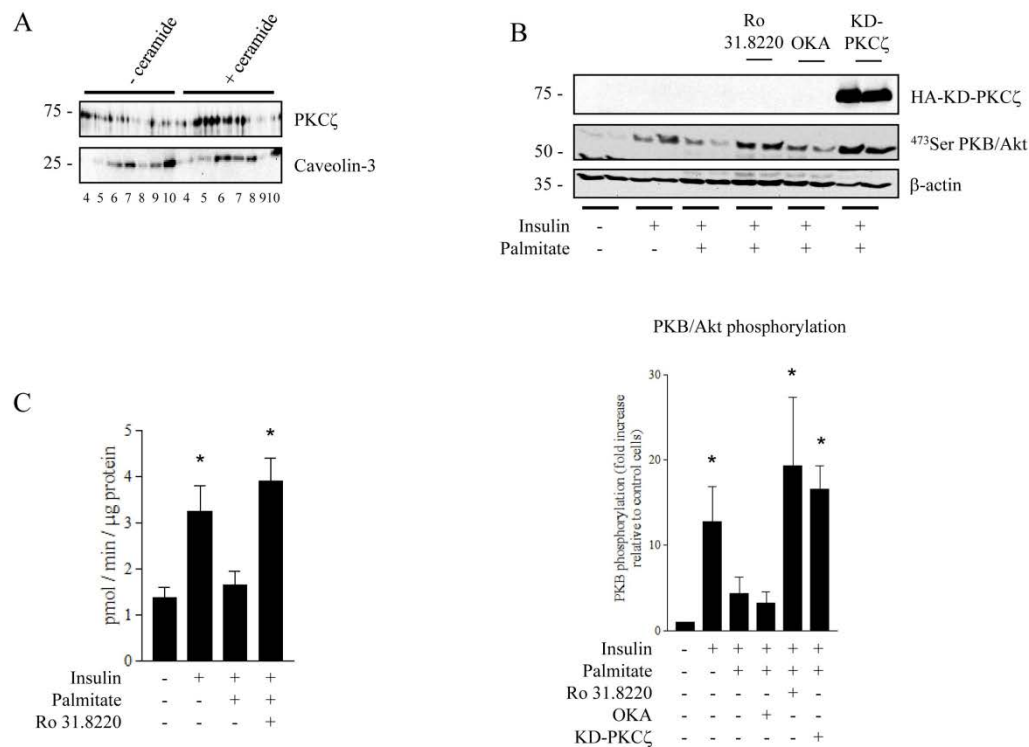
doi:10.1371/journal.pone.0101865.g003

depending on muscle cell type. In rat L6 myotubes, ceramide acts by promoting the activation of PKC $\zeta$  and its subsequent recruitment to plasma membrane CEMs. In contrast, in mouse C2C12 myotubes, ceramide represses PKB/Akt activity through stimulation of cytoplasmic phosphatase PP2A. Importantly, we show that differences in CEM abundance may be an important factor in determining which mechanism is prominent within any particular cell type.

One possible explanation for the observed differences in CEM abundance and distinct modes of ceramide action in these two muscle cell lines, may be partly due to their contrasting abilities to differentiate from myoblasts into mature myotubes. Both L6 and C2C12 myoblasts exhibit characteristic features of muscle myogenesis, including migration and proliferation in medium containing 10% (v/v) foetal calf serum, followed by elongation and fusion to form myotubes following serum reduction. Interestingly, previous studies have shown that L6 cells differentiate readily into myotubes when maintained in medium containing 2% (v/v) serum, whereas C2C12 differentiation is more pronounced in serum-free medium compared to a serum-containing system [26,27]. Thus, under standard conditions used to differentiate both cell lines (i.e. 2% (w/w) serum), it is possible that L6

myotubes mature more rapidly and/or more efficiently than C2C12 myotubes. However, since caveolins are late differentiation markers [28] and we see similar levels of caveolin-3 content in both differentiated cell types (figure 1A), this is unlikely to account for any mechanistic differences, and rather suggest that these two muscle cell models display different membrane characteristics, reinforcing the importance of our study.

Another key finding from this work concerns the identification of the process by which ceramide mediates insulin desensitisation in human muscle cells. To investigate this, we utilised human muscle satellite cells obtained from either insulin sensitive or diabetic donors that we differentiated *in vitro* into mature myotubes. There are several advantages using this cell model, including its morphological, biochemical and metabolic similarity to adult skeletal muscle cells [13]. Importantly, these cultured myotubes have been shown to maintain metabolic properties of the donor [13]. Similar to what we observed in L6 and C2C12 myotubes, we found that treatment of cultured insulin sensitive human myotubes with palmitate led to both an increase in the biosynthesis of three ceramide species (C16-, C18- and C20-ceramides) and an associated reduction in insulin stimulated PKB/Akt activation. Interestingly, the levels of similar ceramide species



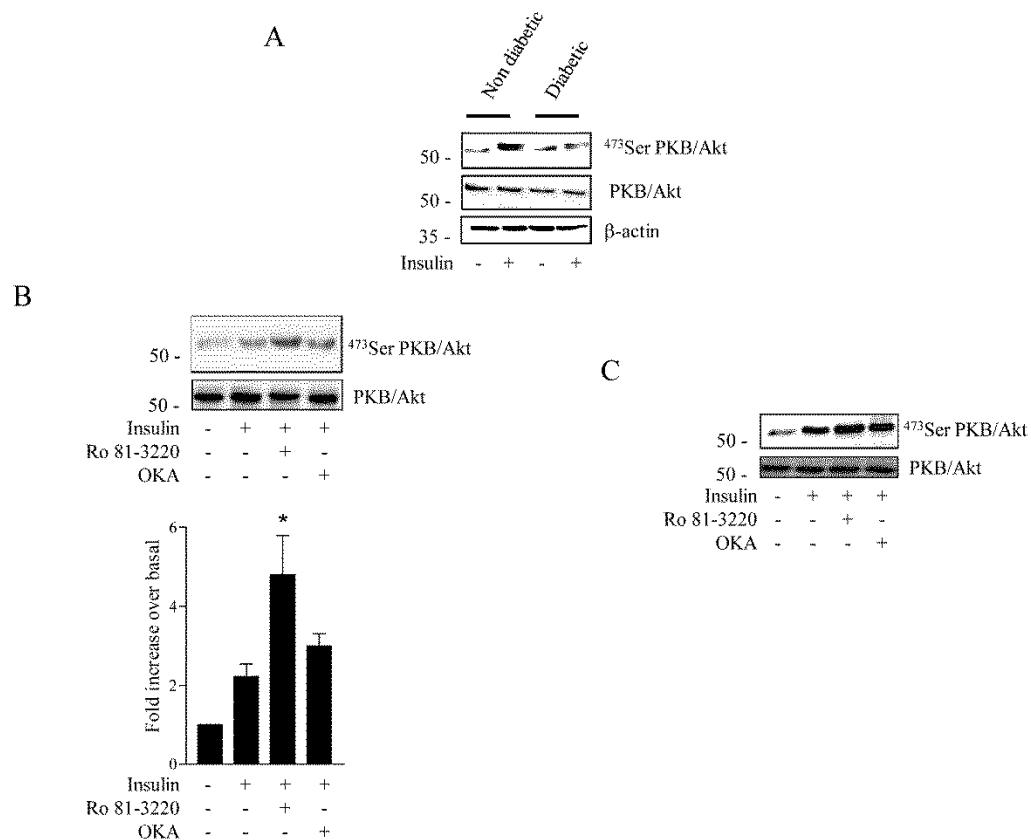
**Figure 4. Ceramide action on the insulin signalling pathway in human myotubes.** A. Human myotubes were treated with 100  $\mu$ M C2-ceramide for 2 h before isolation of DRMs. Equal amounts of protein (1  $\mu$ g) of each fraction were then immunoblotted for the presence of PKC $\zeta$  and caveolin-3. These are representative immunoblots from three independent experiments. B. Human myotubes from control donors were treated with 0.75 mM palmitate for 48 h in the presence or absence of Ro 31.8220 (5  $\mu$ M, 48 h) or OKA (500 nM, last 30 min). KD-PKC $\zeta$ -infected human myotubes were treated with 0.75 mM palmitate for 48 h. Cells were then stimulated with 100 nM insulin for the last 10 min before being lysed. Cell lysates were immunoblotted with antibodies against Ser<sup>473</sup>PKB/Akt,  $\beta$ -actin and hemagglutinin (HA). Scanning densitometry was performed to quantify changes in Ser<sup>473</sup>PKB/Akt abundance in cell lysates. Bars represent mean  $\pm$  SEM. \* denotes significant change  $p < 0.05$  relative to the untreated control. Blots shown represent at least three separate experiments. C. Human myotubes were incubated with 0.75 mM palmitate for 48 h in the presence or absence of Ro 31.8220. Cells were then treated with 100 nM insulin for the last 30 min prior to the measurement of 2-deoxy-glucose uptake as described in the experimental section. Bars represent mean  $\pm$  SEM. \* Significant change  $p < 0.05$  relative to the untreated control ( $n = 3$ ). doi:10.1371/journal.pone.0101865.g004

(C16- and C18-ceramides) have also previously been reported to be increased in myotubes obtained from type 2 diabetic individuals compared to controls [6]. Therefore, these observations suggest that these specific ceramide species may play a key role in mediating the deleterious effects of palmitate upon insulin signal transduction. In accordance with this, we demonstrate that inhibition of endogenous ceramide production with myriocin abolishes palmitate-induced insulin resistance in our human myotubes. Furthermore, in line with our observations in L6 muscle cells [8,9], palmitate-derived ceramide acts to inhibit insulin signalling through activation of the “PKC $\zeta$ -CEM” pathway in human myotubes. Importantly, we confirmed this by using human myotubes that have been made insulin resistant through palmitate exposure, as well as using primary culture of skeletal muscle cells from diabetic patients. It is important to note that the latter cell model has been extensively studied and displays several metabolic defects that characterize *in vivo* insulin resistance of skeletal muscle such as inhibition of insulin stimulated

glucose uptake and glycogen synthesis [24,25,29,30], concomitant with impaired insulin signalling [23,31].

Together, these data implicate the “PKC $\zeta$ -CEM” pathway as an important therapeutic target to counteract the deleterious effects of saturated fatty acids and their derived lipid intermediates upon insulin signalling in muscle cells. It is important to emphasise that myotubes derived from human subjects used in the present study could present altered membrane structure, gene expression and function due to *in vitro* culture and differentiation. Therefore, it would be interesting to confirm our results in intact muscle.

In summary, our study highlights key mechanistic differences by which ceramide can impair insulin action in rat L6 and mouse C2C12 myotubes. Importantly, our findings suggest that the effectiveness of distinct ceramide-induced pathways to promote insulin resistance in these cell lines, namely through activation of atypical PKC isoforms and PP2A respectively, may be determined by cellular CEM abundance and/or composition. Furthermore, we demonstrate for the first time that ceramide acts to repress



**Figure 5. Inhibition of aPKCs sensitizes insulin-resistant human myotubes to insulin.** A. Differentiated myotubes from control donors were incubated with Ro 31.8220 (5  $\mu$ M, 18 h) or OKA (500 nM, last 30 min), then stimulated with 100 nM insulin for the last 10 min before being lysed. Cell lysates were immunoblotted with antibodies against Ser<sup>473</sup>PKB/Akt, total PKB/Akt and  $\beta$ -actin. B. Differentiated myotubes from diabetic patients were incubated with Ro 31.8220 (5  $\mu$ M, 18 h) or OKA (500 nM, last 30 min), then stimulated with 100 nM insulin for the last 10 min before being lysed. Cell lysates were immunoblotted with antibodies against Ser<sup>473</sup>PKB/Akt and total PKB/Akt. Scanning densitometry was performed to quantify changes in Ser<sup>473</sup>PKB/Akt abundance over total PKB/Akt protein expression in cell lysates. Bars represent mean  $\pm$  SEM. \* denotes significant change  $p < 0.05$  relative to the insulin treated cells. doi:10.1371/journal.pone.0101865.g005

insulin-induced PKB/Akt signalling in primary human myotubes through a pathway dependent on PKC $\zeta$ . Together, these data raise awareness of the key role that cell membrane structure and/or composition may play in determining the effectiveness and/or predominance of those pathways which can potentially cause insulin resistance in different skeletal muscle cell models. Furthermore, our findings emphasise the need for caution when interpreting and comparing data from different muscle cell lines, particularly when exploring the role of fatty acid derived lipids such as ceramide in the modulation of insulin-regulated signalling and its associated processes.

### Supporting Information

**Figure S1 A: L6 myotubes treated with or without 100  $\mu$ M C2-ceramide in the presence of different concentrations of Ro 31-8220 for 2 h, prior to stimula-**

**tion with insulin (100 nM for 10 min).** B: C2C12 myotubes treated with or without 100  $\mu$ M C2-ceramide for 2 h in the presence of different concentrations of OKA for the last 30 min, prior to stimulation with insulin (100 nM for 10 min). (TIF)

### Acknowledgments

We would like to thank F. Koskas, J. Gaudric, C. Gouffier, C. Jouhannet and T. Khalife (Service de Chirurgie Vasculaire, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France) for the collection of human diabetic samples. We are grateful to J.-T. Vilquin (Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France) and the tissue bank of the Association Française des Myopathies (AFM) for human control biopsy samples.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PF FF HSH EH. Performed the experiments: RM RK ST AB-Z NL CL CS. Analyzed the data: PF FF

HSH EH. Contributed reagents/materials/analysis tools: OB. Contributed to the writing of the manuscript: CL ST FF EH.

## References

- Sesti G (2006) Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20: 665–679.
- Lipina C, Hundal HS (2011) Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia* 54: 1596–1607.
- Turban S, Hajdich E (2011) Protein kinase C isoforms: Mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett* 585: 269–274.
- Coen PM, Dube JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Ferrell RE, et al. (2010) Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content. *Diabetes* 59: 80–88.
- Amati F, Dube JJ, Carnero EA, Edreira MM, Chomentowski P, et al. (2011) Skeletal-Muscle Triglycerides, Diacylglycerols, and Ceramides in Insulin Resistance: Another Paradox in Endurance-Trained Athletes? *Diabetes* 60: 2588–97.
- Bajpeyi S, Myrland CK, Govington JD, Obanda D, Cefalu WT, et al. (2013) Lipid in skeletal muscle myotubes is associated to the donors' insulin sensitivity and physical activity phenotypes. *Obesity (Silver Spring)* 22(2): 426–34.
- Hajdich E, Litherland GJ, Hundal HS (2001) Protein kinase B (PKB/Akt) a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 492: 199–203.
- Hajdich E, Balendran A, Batty IH, Litherland GJ, Blair AS, et al. (2001) Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia* 44: 173–183.
- Powell DJ, Hajdich E, Kular G, Hundal HS (2003) Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKC $\zeta$ -Dependent Mechanism. *Mol Cell Biol* 23: 7794–7809.
- Hajdich E, Turban S, Le Liepvre X, Le Lay S, Lipina C, et al. (2008) Targeting of PKC $\zeta$  and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem J* 410: 369–379.
- Blouin CM, Prado C, Takane KK, Lasnier F, Garcia-Ocana A, et al. (2010) Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* 59: 600–610.
- Cazzolli R, Carpenter L, Biden TJ, Schmitz-Peiffer C (2001) A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase C $\zeta$ , in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* 50: 2210–2218.
- Aas V, Bakke SS, Feng YZ, Kase ET, Jensen J, et al. (2013) Are cultured human myotubes far from home? *Cell Tissue Res* 354: 671–82.
- Hajdich E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS (1998) Constitutive activation of protein kinase B  $\alpha$  by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47: 1006–1013.
- Vilquin JT, Marolleau JP, Sacconi S, Garcin I, Lacassagne MN, et al. (2005) Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther* 12: 1651–1662.
- Hage Hassan R, Hainault I, Vilquin JT, Samama C, Lasnier F, et al. (2012) Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55: 204–214.
- Blachnio-Zabielska AU, Persson XM, Koutsari C, Zabielski P, Jensen MD (2012) A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for measuring the in vivo incorporation of plasma free fatty acids into intramyocellular ceramides in humans. *Rapid Commun Mass Spectrom* 26: 1134–1140.
- Blair AS, Hajdich E, Litherland GJ, Hundal HS (1999) Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 274: 36293–36299.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Parton RG, del Pozo MA (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 98–112. nrm3512 [pii]; 10.1038/nrm3512 [doi].
- Megha, London E (2004) Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem* 279: 9997–10004.
- Watson ML, Coghlan M, Hundal HS (2009) Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Biochem J* 417: 791–801.
- Cozzzone D, Frojdo S, Disse E, Debad C, Laville M, et al. (2008) Isoform-specific defects of insulin stimulation of Akt/protein kinase B (PKB) in skeletal muscle cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 51: 512–521.
- Gaster M, Petersen I, Hojlund K, Poulsen P, Beck-Nielsen H (2002) The diabetic phenotype is conserved in myotubes established from diabetic subjects: evidence for primary defects in glucose transport and glycogen synthase activity. *Diabetes* 51: 921–927.
- Jackson S, Bagstaff SM, Lynn S, Yeaman SJ, Turnbull DM, et al. (2000) Decreased insulin responsiveness of glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells from insulin-resistant nondiabetic relatives of type 2 diabetic families. *Diabetes* 49: 1169–1177.
- Lawson MA, Purslow PP (2000) Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs* 167: 130–137.
- Kubo Y (1991) Comparison of initial stages of muscle differentiation in rat and mouse myoblastic and mouse mesodermal stem cell lines. *J Physiol* 442: 743–759.
- Blouin CM, Le Lay S, Lasnier F, Dugail I, Hajdich E (2008) Regulated association of caveolins to lipid droplets during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 331–335.
- Gaster M, Kristensen SR, Beck-Nielsen H, Schroder HD (2001) A cellular model system of differentiated human myotubes. *APMIS* 109: 735–744.
- Giaraldi TP, Abrams L, Nikoulina S, Mudaliar S, Henry RR (1995) Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. Regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 96: 2820–2827.
- Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F, et al. (2003) Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 1319–1325.



## **II. Importance du transporteur des céramides CERT dans le développement de l'insulino-résistance musculaire**

Rana Mahfouz<sup>1,2,3</sup>, Aurélie Carlier<sup>1,2,3</sup>, Agnieszka Blachnio-Zabielska<sup>4</sup>, Hervé Le Stunff, Dušan Berkeš<sup>5</sup>, Fabienne Fougelle<sup>1,2,3</sup>, and Eric Hajdúch<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France;

<sup>2</sup> Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR-S 1138, Paris, F-75006 France;

<sup>3</sup> Université Paris Descartes, UMR-S 1138, Paris, F-75006 France ;

<sup>4</sup> Department of Physiology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland;

<sup>5</sup> Department of Organic Chemistry, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia

Ci-dessous, le résumé des principaux résultats de l'article en préparation.

## **A- Introduction**

Le muscle émerge comme un acteur clef dans la régulation de la balance énergétique puisqu'il contribue à un captage important du glucose en période postprandial et évite ainsi par la suite les hyperglycémies entre les repas. Des observations ont montré que les céramides, dont les concentrations sont augmentées au cours de l'obésité et du diabète de type 2, altèrent la signalisation insulinaire, empêchant ainsi la stimulation par l'insuline du captage du glucose au niveau musculaire. Les céramides sont connus pour fonctionner comme second messager dans plusieurs processus cellulaires (apoptose, différenciation, insulino-résistance) et leur accumulation intracellulaire semble être à l'origine de leurs effets (Summers and Nelson, 2005). Afin d'être métabolisé en d'autres métabolites lipidiques moins délétères, les céramides doivent être transportés du réticulum endoplasmique ou ils sont produits vers l'appareil de Golgi. Ce transport se fait principalement par l'intermédiaire d'une protéine appelée CERT (CERamide Transport). Cependant, aucune étude jusqu'à aujourd'hui, n'a investigué si l'accumulation des céramides observée dans des situations d'insulino-résistance est associée ou non à une altération de l'expression/activité de ce transporteur CERT au niveau musculaire. Le but de notre étude est d'essayer de savoir si l'expression/activité de CERT joue un rôle important dans le maintien de la sensibilité des cellules musculaires à l'insuline.

## **B- Résultats**

Dans un premier temps, nous avons quantifié l'expression du transporteur CERT dans plusieurs modèles de lipotoxicité musculaire (cellules musculaires en culture traitées avec du palmitate, lysats musculaires de souris nourries avec un régime hyper-lipidique ou souris génétiquement obèses ob/ob, myotubes provenant de sujets diabétiques). Dans toutes les conditions, nous avons observé une diminution de l'expression de CERT.

Afin de décrypter les mécanismes à l'origine de l'altération de l'expression de CERT, nous nous sommes posés plusieurs questions :

- (a) Est-ce que les acides gras insaturés ont le même effet que le palmitate (saturé) sur CERT ?
- (b) Est-ce que les céramides produites en réponse au palmitate sont responsables de l'altération de CERT ?

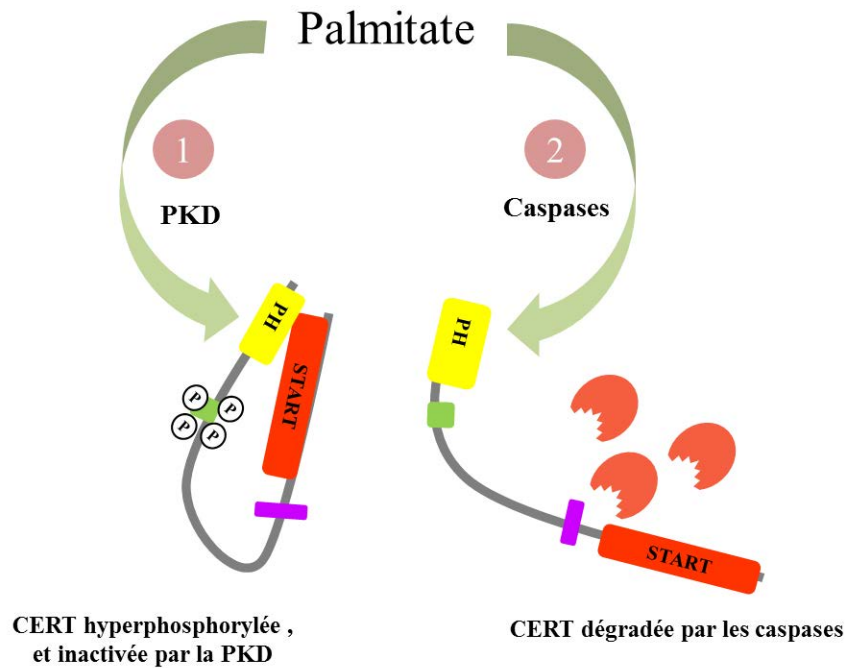


- (c) Est-ce que le stress du RE ou le protéasome, ou des caspases activées dans des conditions lipotoxiques sont responsable de cette altération ?
- (d) Est-il possible d'empêcher les céramides d'agir sur la voie insulinique en rétablissant l'expression de CERT dans des conditions lipotoxiques ?

Nous avons utilisé les myotubes C2C12 que nous avons traité avec différents types d'acides gras (palmitate (saturé), oléate ou linoléate (insaturés)). Nos résultats montrent que seul un acide gras saturé (palmitate) agit négativement sur l'expression de CERT. Inversement, les acides gras insaturés protègent l'expression de CERT de l'action délétère du palmitate.

Nous avons aussi traité les cellules directement avec des C2-céramides et à partir de 16h d'incubation, l'altération de CERT est observée.

Nous avons ensuite décrypté le mécanisme par lequel le palmitate inhibe l'expression de CERT dans les cellules musculaires. Nous avons mis en évidence que, ni un stress du RE, ni le protéasome, deux voies induites par le palmitate, ne relayaient l'action du lipide sur CERT. Cependant, des études ont montré que certaines caspases sont activées dans des situations de stress pro-apoptotique (Chandran and Machamer, 2012a) et nous avons montré que les caspases 3 et 7 sont activées en réponse au palmitate, et qu'elles sont responsables de la diminution de l'expression de CERT dans les myotubes C2C12 (figure 16).



**Figure 16: Régulation de l'activité/expression du transporteur CERT.**

Le palmitate régule négativement CERT en :

- ☐ activant la PKD (protéine kinase D) qui phosphoryle les résidus sérine de CERT, diminuant ainsi l'activité de CERT.
- ☐ activant des caspases qui dégradent la protéine CERT

Pour déterminer si l'expression de CERT est importante pour le maintien de la sensibilité à l'insuline dans des conditions lipotoxiques, nous avons inhibé l'activation des caspases par le palmitate, et nous avons suivi la signalisation insulinique en quantifiant la phosphorylation de la PKB/Akt, protéine jouant un rôle clef dans la propagation du signal de l'hormone. Nos résultats montrent que l'inhibition de l'activation des caspases en présence de palmitate améliore fortement sensibilité à l'insuline des cellules.

Nous avons ensuite confirmé l'importance du transport des céramides du RE vers le Golgi en inhibant artificiellement l'activité ou l'expression de CERT. Dans les deux cas, nous montrons que l'action du palmitate sur CERT est potentialisée.

A l'inverse, nous avons surexprimé CERT dans les myotubes C2C12. Cette surexpression compense l'effet inhibiteur du palmitate sur l'expression de CERT endogène et améliore la sensibilité à l'insuline dans les cellules musculaires dans des conditions lipotoxiques.

## **C- Conclusion**

Nos résultats montrent que le transporteur CERT joue un rôle important dans les mécanismes qui conduisent au développement de l'insulinorésistance musculaire puisque sa présence est essentielle pour le maintien d'un trafic normal des céramides entre le RE et le golgi où ils sont transformés en SM.

La compréhension de la régulation de cet acteur régulant l'accumulation des céramides en présence d'excès lipidique est donc un enjeu important car CERT pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour améliorer la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires.

## **Importance of ceramide transporter CERT in the development of muscle insulin resistance.**

Rana Mahfouz<sup>1,2,3</sup>, Aurélie Carlier<sup>1,2,3</sup>, Agnieszka Blachnio-Zabielska<sup>4</sup>, Hervé Le Stunff, Fabienne Fougelle<sup>1,2,3</sup>, and Eric Hajduch<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France;

<sup>2</sup> Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR-S 1138, Paris, F-75006 France;

<sup>3</sup> Université Paris Descartes, UMR-S 1138, Paris, F-75006 France ;

<sup>4</sup> Department of Physiology, Medical University of Bialystok, Bialystok, Poland;

## Introduction

Il devient de plus en plus évident que les céramides jouent un rôle important dans la résistance à l'insuline, un état métabolique dans lequel les cellules ne parviennent pas à répondre à des niveaux normaux d'insuline. Diverses études révèlent qu'un excès d'acides gras libres, l'administration de glucocorticoïdes, l'obésité et le manque d'exercice physique sont des facteurs importants menant à l'insulinorésistance. En utilisant des cellules en culture, des modèles d'animaux et patients humains, il a été démontré que les céramides étaient l'intermédiaire lipidique second messenger clé commun à toutes ces conditions d'insulinorésistance (Summers and Nelson, 2005).

Des données pionnières ont impliqué les céramides dans le développement d'un phénomène de résistance à l'insuline *via* l'application directe *in vitro* de ces lipides sur des cellules adipocytaires et musculaires en culture. Ces études indiquent que les céramides inhibent rapidement le captage du glucose et la synthèse de glycogène insulino-stimulés en bloquant la voie de signalisation de l'hormone au niveau de la protéine kinase B (PKB/Akt), une protéine qui joue un rôle essentiel dans la régulation de l'utilisation du glucose dans les adipocytes et les cellules musculaires en réponse à l'insuline (Summers et al., 1998; Hajdуч et al., 2001; Wang et al., 1998).

Dans le contexte de l'obésité associée à une surcharge en acides gras, les céramides sont principalement produits *de novo* à partir d'acides gras saturés (palmitate). Cette synthèse a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) par différentes réactions qui commencent par la condensation de la L-sérine avec le palmitoyl-CoA pour aboutir après plusieurs réactions à des céramides. L'implication des céramides comme relayant l'action délétère des acides gras saturés a été confirmé en incubant des cellules musculaires L6 et C2C12 avec du palmitate (Schmitz-Peiffer et al., 1999b; Powell et al., 2004b).

Notre laboratoire a mis en évidence le mécanisme par lequel les céramides inhibent la voie de signalisation insulinique dans les cellules musculaires L6 et humaines. Nous avons montré que les céramides activent la protéine kinase C atypique PKC $\delta$ , qui interagit et phosphoryle le domaine PH de la PKB/Akt sur un résidu Thr34/Ser34, induisant ainsi la séquestration de la PKB/Akt dans des domaines spécialisés de la membrane plasmique appelé Microdomaines Enrichis en Cavéoline (MEC) (Hajdуч et al., 2008b). Ce ciblage de la PKB/Akt dans ces MEC empêche ainsi la PKB/Akt d'être recrutée à la membrane plasmique où elle est normalement activée en réponse à l'insuline (Hajdуч et al., 2008b; Powell et al., 2003;

Blouin et al., 2010b; Mahfouz et al., 2014a). Nous avons montré que ce mécanisme existe aussi bien dans les cellules musculaires L6 (Hajdуч et al., 2008b), que dans des myotubes humains mis en culture primaire (Mahfouz et al., 2014a). De plus, nous avons montré très récemment qu'en empêchant l'activation de PKC $\delta$  par les céramides, il était possible d'améliorer la réponse à l'insuline des cellules musculaires humaines provenant de sujets diabétiques (Mahfouz et al., 2014a). Tous ces résultats indiquent donc que l'accumulation d'acides gras saturés (palmitate) dans les cellules est lipotoxique et induit une insulino-résistance *via* la synthèse de céramides.

Les céramides et leurs dérivés sphingolipidiques jouent un rôle majeur comme seconds messagers lipidiques, en particulier dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Spiegel et al., 1996). Cependant, les réponses cellulaires induites par les céramides dépendent grandement de leur localisation subcellulaire. Parce que les céramides sont synthétisés *de novo* dans le RE et sont convertis en sphingomyélines (SM) et en glucosylcéramides (GlcCer) au niveau de l'appareil de Golgi, le transport intracellulaire des céramides du RE vers le Golgi implique l'existence de transporteurs spécifiques impliquant à la fois des mécanismes indépendants et dépendants de l'ATP.

Les céramides destinés à être métabolisés en GlcCer au niveau de la face cis du Golgi sont transportés via un transporteur vésiculaire ATP indépendant. Ce transporteur assure le transport des céramides à longue chaîne (> C20) et n'a pas été bien caractérisé. Nous savons juste que son activité est dépendante de la PI3K.

Les céramides destinés à être transformés en SM sont transportés du RE vers le Golgi par l'intermédiaire d'un transporteur non-vésiculaire appelé céramide transporteur (CERT) dont l'activité est ATP dépendante.

Le transporteur CERT transporte efficacement les céramides-C14, -C16, -C18 et -C20, mais pas ceux avec de plus longues chaînes acyles. La région carboxy-terminale de CERT, constituée de 230 acides aminés, contient un domaine START qui est responsable de la liaison stéréospécifique des céramides, alors que la région amino-terminale, constitué de 120 acides aminés, contient un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) qui se lie au phosphatidylinositol 4-monophosphate présent au niveau de l'appareil de Golgi. La zone médiane, entre le domaine PH et la région START, possède un motif peptidique FFAT qui interagit avec une protéine membranaire appelée VAP dans le RE. Grâce à ce transporteur CERT, les céramides sont extraits de la surface du RE pour être transportés vers le Golgi.

Les céramides synthétisés dans le RE sont donc rapidement transportés dans le Golgi *via* CERT et métabolisés en SM, *via* la SM synthase 1 (SMS1), enzyme qui catalyse la conversion de céramides en SM dans ce compartiment subcellulaire.

De manière intéressante, la transformation des céramides en SM dans l'appareil de Golgi pourrait être une étape importante pour empêcher les céramides d'agir négativement dans les cellules. Plusieurs raisons nous font penser que les concentrations en SM intracellulaires sont inversement corrélées avec la possibilité de développer un diabète de type 2. Premièrement, une étude métabolomique récente a identifié des métabolites sanguins pouvant être associés avec un risque de diabète de type 2. De manière intéressante, ils ont trouvé que des concentrations réduites de SM étaient prédictives d'un diabète de type 2 (Floegel et al., 2013). De plus, des souris déficientes pour la SMS1 (donc ne produisant plus de SM dans le Golgi) présentent de graves anomalies de sécrétion d'insuline et développent un diabète (Yano et al., 2011b). De plus, un traitement par du palmitate de myotubes C2C12 pour les rendre résistantes à l'insuline, a pour conséquence une diminution des concentrations de SM dans les cellules (Hu et al., 2011).

Ces résultats suggèrent donc que la voie de biosynthèse des SM à partir des céramides pourrait être protectrice pour les cellules et que des changements de fonctionnalité du transporteur des céramides CERT ou/et de la SMS1, pourraient avoir des répercussions importantes dans le contrôle du devenir des céramides nouvellement synthétisés.

Le but de cette étude a donc été d'en savoir un peu plus sur la régulation de l'expression/activité de CERT dans des conditions lipotoxiques et de voir si des modulations artificielles de son expression/activité pourraient améliorer la sensibilité à l'insuline de cellules musculaires dans des conditions d'excès lipidique.

## Méthodes

*Matériels-* Tous les agents chimiques, l'insuline, le palmitate, et le BSA ont été obtenu chez Sigma-Aldrich. Le C<sub>2</sub>-céramide est obtenu chez Cayman Chemical Company. Les anticorps dirigés contre la PKB/Akt totale, la Ser473-PKB/Akt, le Thr308-PKB/Akt et la Ser916-PKD/PKC $\mu$  sont de chez Cell Signalling (New England Biolabs). L'anticorps dirigé contre CERT est de chez Bethys Laboratories et celui dirigé contre la  $\beta$ -actine de chez Sigma-Aldrich. Les anticoprs secondaires peroxidase horseradish anti-lapin, -souris et -chèvre sont de chez Laboratoires Jackson et le substrat chimioluminescent est de chez Pierce-Perbio Biotechnology. Le D-(U-<sup>14</sup>C) glucose est de chez PerkinElmer.

*Culture des cellules C2C12-* Les myoblastes C2C12 ont été maintenus dans un milieu Dulbecco Eagle modifié (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Pour induire leur différenciation, les myoblastes arrivés à confluence, ont été incubés dans du DMEM contenant 2% de sérum de cheval. La lignée cellulaire est maintenue à 37°C dans une atmosphère humide de 5% CO<sub>2</sub>. Les myotubes sont utilisés 4 jours après l'induction de leur différenciation.

*Cellules musculaires squelettiques humaines-* Des biopsies de volontaires adultes sains et maigres ont été obtenues dans le contexte d'expériences précliniques et cliniques approuvées (Vilquin et al., 2005) *via* la Myobanque de l'Association Française contre les Myopathies (AFM), en accord avec la loi bioéthique française (loi no 94-654 of 29 Juillet 1994, modifiée 22 Janvier 2002). Les échantillons de patients diabétiques adultes ont été obtenus à partir de tissu sain après l'amputation. Les échantillons musculaires frais ont été émincés et dissociés dans de la collagénase. Les cellules satellites ont été purifiées, cultivées et différenciées en myotubes comme décrit précédemment (Hage Hassan et al., 2012).

*Expériences ex vitro sur muscle de souris-* Des expériences ont été menées sur des modèles in vivo d'insulino-résistance : des souris ob/ob (souris présentant une obésité génétique par mutation du gène de la leptine) et des souris C57Bl6 présentant une insulino-résistance nutritionnelle (souris nourries par régime riche en gras, à 60% de calories, pendant 8 semaines). Les souris sont élevées en cycle jour/nuit de 12 heures, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. L'insulino-résistance a été vérifiée par un test de tolérance au glucose une



semaine avant le sacrifice. Après sacrifice, les différents tissus sont prélevés puis congelés immédiatement dans de l'azote liquide. Le tissu musculaire provenant des pattes arrières (essentiellement muscles soléaire et gastrocnémien) est prélevé, mis en poudre dans un mortier, homogénéisé et lysé dans une solution permettant d'extraire les ARN.

*Transfection des myotubes C2C12 par des ARN interférents (si RNA) dirigés contre CERT-* 25 nmol/l du siRNA dirigé contre CERT ou la même concentration d'un siRNA non spécifique ont été transfectés pendant 96h dans des myotubes C2C12 en utilisant le réactif de transfection DharmaFECT.

*Infection des myotubes C2C12 par un adénovirus CERT-* L'infection des myotubes C2C12 avec l'adénovirus CERT (150 MOI) a été réalisée le lendemain de l'induction de la différenciation des myoblastes en myotubes. Les myotubes ont été ensuite traités avec du palmitate (0.75mM, 16h) et lysés 48h après l'infection.

*RT-PCR en temps réel-* Les ARN totaux sont extraits des cellules musculaires par la méthode de Chomczynsky et Sacchi. Un microgramme d'ARN totaux sont d'abord dénaturés pendant 10min à 65°C. Aux ARNs sont ensuite ajoutés la transcriptase inverse M-MLV (200U), les 4 desoxyribonucléotides (1 µM), des hexadésoxynucléotides (6U) de séquence aléatoire qui serviront d'amorces pour le début de la RT, et du DTT. Deux tubes témoins sont également préparés, l'un contenant de l'eau et le mélange avec enzyme et l'autre témoin négatif contenant une fraction de l'un des échantillons et le mélange sans enzyme. Les amorces anti-sens (20µM) et sens (20µM) du gène à amplifier (CERT de chez Eurogentec) ont pour séquences respectivement: TCT-GCT-TAT-CTC-CTG-GTC-TCC-C et CGA-AAG-ATC-CCA-GCC-TTG-AC. Les résultats sont normalisés en fonction du gène de l'ARN ribosomal 18S.

*Dosage des céramides-* Le dosage des concentrations intracellulaires des différentes espèces de céramides a été réalisé en collaboration avec Agnieszka Blachnio-Zabielska, Pologne, par une analyse par High Performance Layer Chromatography (HPLC) couplée à de la spectrométrie de masse après extraction des lipides.

*Transport de glucose*- Le transport de glucose a été mesuré en incubant les cellules avec 10  $\mu$ M de 2-deoxy-[3H]-D-glucose (1  $\mu$ Ci/ml) pendant 10 min comme décrit précédemment (Blair et al., 1999).

*Mesure de l'activité des caspases 3 et 7*- Les myoblastes C2C12 ont été traités, soit avec de la BSA (1,5%) ou bien avec du palmitate (0.5mM) en présence ou non de l'inhibiteur des caspases Q-VD-Oph (10 $\mu$ M).Après 24h, la mesure d'activité des caspases 3 et 7 sont réalisées à l'aide du kit Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega). Le principe de ce kit est basé sur le clivage d'un substrat par les caspases 3 et 7, le Z-DEVD-Rhodamine 110, qui fluoresce alors sous une lumière d'excitation de 521nm. La quantité de produit fluorescent générée est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque Fluostar toutes les 6 minutes pendant 2 heures. Elle est représentative de l'activité caspases 3/7 dans l'échantillon. L'activité spécifique des caspases 3/7 est exprimée en valeur arbitraire. Chaque expérience est réalisée en tripe.

*Fluorescence* - Les cellules C2C12 sontensemencées et différenciées sur coverslip. Les myotubes différenciés sont traités avec du palmitate à 0,75mM pendant 16h à 37°C, puis avec du Bodipy-C5 céramide (2.5 $\mu$ M, 30min) à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et incubées à 37°C pendant 30 min. Les cellules sont ensuite fixées avec du PBS/0,5% glutaraldéhyde pendant 10 min à 4°C et observées au microscope à fluorescence (Abs 404nm).

*Préparation des lysats totaux*- Les myotubes ont été lavés dans une solution saline 0,9% et lysés dans un tampon de lyse approprié (50mM Tris, pH7.4; 0.27M sucrose; 1mM Na-orthovanadate pH10; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 10mM Na- $\beta$ -glycérophosphate; 50mM NaF; 5mM Na-pyrophosphate; 1% (w/v) Triton X-100; 0.1% (v/v) 2-mercaptoéthanol; et un mélange d'inhibiteurs de protéase). Les lysats sont ensuite centrifugés 10 minutes à 10 000 g puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

*Immunoprécipitation* – 300 $\mu$ g de lysat protéique sont incubés avec 5 $\mu$ g d'anticorps dirigés contre CERT la nuit à 4°C. 50 $\mu$ l de billes de sépharose (protéin A) sont ensuite ajoutées et laissées incuber 2 h de plus à 4°C. Le complexe protéique/anticorps/billes est lavée à 4°C dans du PBS/NaCl, puis y est ajouté 50 $\mu$ l de tampon Leammli. Le tout est chauffée à 99°C pour casser le complexe, centrifugé, et les protéines contenues dans le surnageant sont séparées et identifiées par Western Blot.

*Western Blot*- Les échantillons sont dénaturés dans un tampon contenant 360 mM Tris, pH 6,8 ; 30% glycérol ; 0,015% bleu de bromophénol ; 10% SDS ; 250 mM DTT, puis déposés sur un gel dénaturant (SDS) de polyacrylamide à 10%. Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite incubées avec différents anticorps comme décrit dans les légendes des figures. La détection des anticorps primaires se fera grâce à différents anticorps secondaires couplés à la peroxydase. Les protéines recherchées sont visualisées par chimioluminescence.

*Traitement avec les acides gras*- les cellules sont traités avec du palmitate conjugué au BSA (sans acide gras) (Hage Hassan et al., 2012). Brièvement, le palmitate (50mM) est dissout dans l'éthanol, puis conjugué à de l'albumine (10% BSA wt/vol) dans du DMEM par chauffage (37°C pendant 2 heures). La concentration finale de la BSA dans le milieu de culture est de 1.5%.

*Analyse statistique*- Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le t test. Les Data ont été considéré statistiquement significatifs aux valeurs  $p \leq 0.05$  et notifiés par \*.

## Résultats

### *Le palmitate altère la distribution intracellulaire des céramides dans la lignée musculaire C2C12.*

Afin de déterminer si la distribution intracellulaire des céramides est altérée en présence d'un excès d'acide gras, des myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate pendant 16h et du Bodipy-C5 céramide est ajouté pendant les 30 dernières minutes d'incubation dans le but de mimer la distribution intracellulaire des céramides dans les cellules (figure 1A). Le Bodipy-C5 céramide est communément utilisé comme marqueur du Golgi en immunofluorescence (Marks et al., 2008).

Dans les cellules contrôles, les céramides fluorescents s'accumulent dans des régions juxtanucléaires correspondant à l'appareil de golgi (figure 1A) alors que dans les conditions lipotoxiques (palmitate), les céramides fluorescents restent principalement localisés autour du noyau. Ces résultats suggèrent que le palmitate entraîne une diminution du transport des céramides du réticulum endoplasmique au golgi.

### *L'expression de CERT est altérée dans des conditions lipotoxiques dans les cellules musculaires.*

La figure 1B montre que l'expression de la protéine CERT est diminuée dans les myotubes C2C12 traités avec palmitate à 0,75mM pendant 16h. Une diminution de l'expression de CERT est aussi observée dans des lysats musculaires de souris rendues insulino-résistantes par un régime hyperlipidique (8 semaines) et dans des lysats de muscle de souris génétiquement obèses et insulino-résistantes (ob/ob) (figure 1C). De même, une diminution d'expression de CERT est aussi observée dans des myotubes humains traités avec palmitate à 0,75mM pendant 16h et des cellules musculaires de patients diabétiques par rapport à des cellules musculaires contrôles (figure 1D). Il est important de noter que deux variants de CERT existent. Ils sont appelés CERT et CERT<sub>L</sub> (68kDa et 71kDa) (Hanada, 2014), et suivant la préparation des tissus ou des cellules, ils apparaissent ou non (Figure 1C et figure 2B-C).

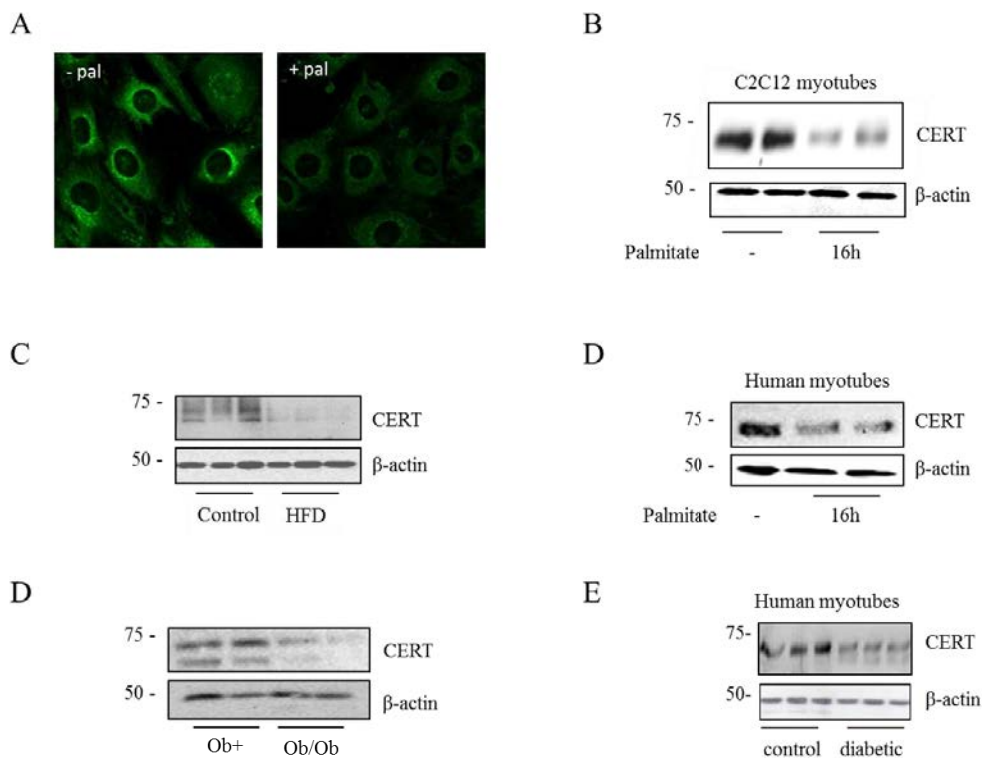
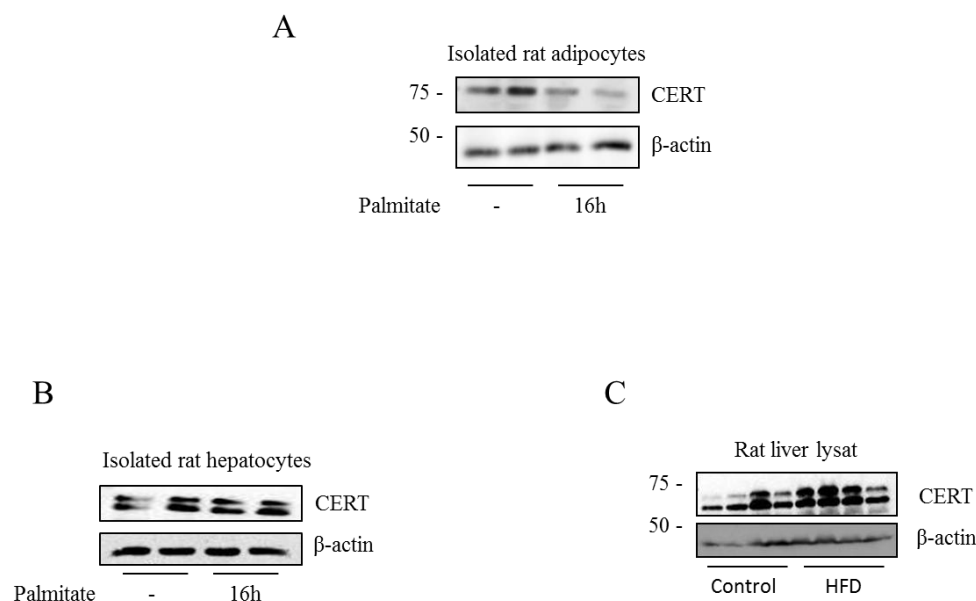


Figure 1

**Figure 1 : Effet de la lipotoxicité sur la localisation subcellulaire des céramides et l'expression de CERT dans les cellules musculaires.**

A. Les myotubes C2C12 ont été cultivés sur lamelle et traités avec ou sans palmitate (0,75mM) pendant 16 heures, puis avec 5  $\mu$ M BODIPY-C5 Cer complexé avec de la BSA (1:1) pendant 30 min à 4 ° C. Les cellules marquées ont ensuite été incubées à 37 ° C pendant 30 min et la fluorescence analysée au microscope. (B) Des myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate (0.75mM) pendant 16h avant d'être lysées. (C-D) Du muscle de souris HFD ou de souris Ob/Ob a été lysé. (E) Des myotubes humain ont été traités avec du palmitate (0.75mM) pendant 16h avant d'être lysées. (F) Des myotubes de sujets contrôles ou de patients diabétiques ont été lysés. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membranes de nitrocellulose. Ces dernières ont été ensuite incubées avec des anticorps dirigés contre la protéine CERT et la  $\beta$ -actine.



**Figure 2: Spécificité tissulaire de l'altération de CERT.**

(A) Des adipocytes isolées ou (B) des hépatocytes isolés de rat de rat ont été traités avec du palmitate (0.75mM) pendant 16h avant d'être lysées. (C) Du foie de de souris nourries avec un régime hyperlipidique a été lysé. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membranes de nitrocellulose. Ces dernières ont été ensuite incubées avec des anticorps dirigés contre la protéine CERT et la β-actine

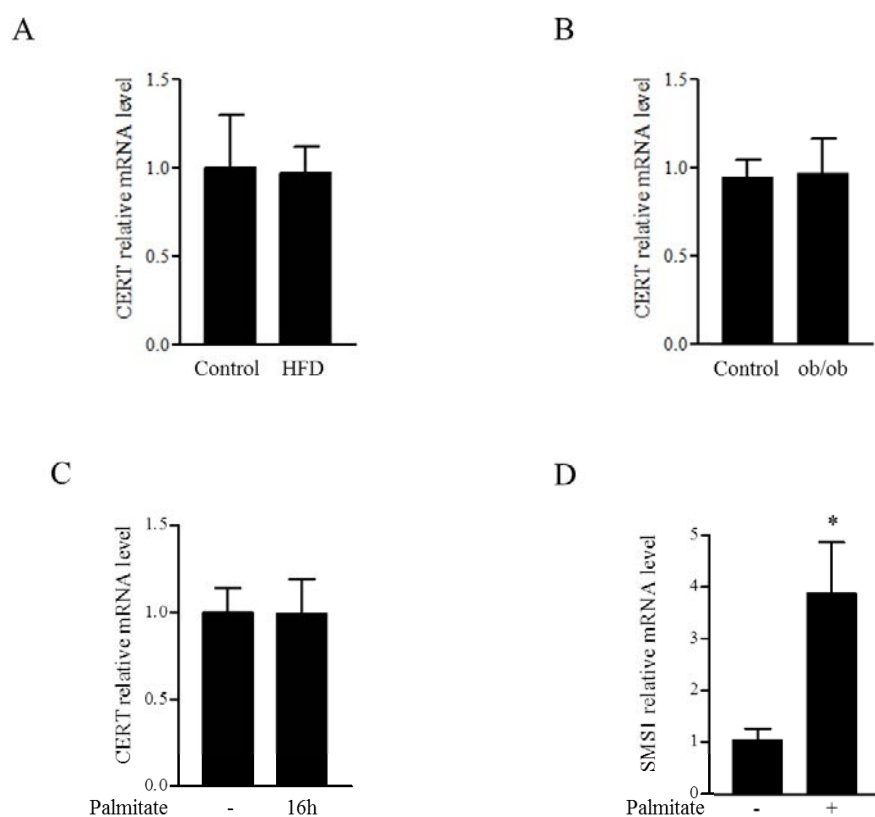
Des résultats similaires ont été observés dans des adipocytes de rats traités avec des concentrations identiques de palmitate (0,75mM) pendant 16h (figure 2A). Il est intéressant de noter que cette chute d'expression de CERT est tissu-spécifique car elle n'est pas observée dans des hépatocytes isolés de rat traitées avec du palmitate (figure 2B) ou des lysats de foie de souris sous régime gras (figure 2C).

Nous avons ensuite voulu savoir si CERT était régulé transcriptionnellement par le palmitate dans les cellules musculaires. La figure 3A montre qu'*in vivo*, les ARNm de CERT ne sont pas affectés chez les souris nourries sous régime gras, ni chez les souris ob/ob comparé aux souris contrôles. De même, *in vitro*, l'expression de l'ARNm de CERT n'est pas inhibée en réponse à 16h de palmitate dans les myotubes C2C12 (figure 3B), suggérant que l'altération de CERT observée dans des conditions lipotoxiques n'est pas transcriptionnelle mais post-traductionnelle.

#### *Le palmitate augmente les ARNm de SMS1 dans des myotubes C2C12*

La diminution de concentration de SM observée dans les cellules musculaires dans des conditions lipotoxiques (Hu et al., 2011) pourrait aussi être la conséquence directe d'une

diminution de l'expression de la SMS1. Nous avons donc mesuré les ARNm de la SMS1 par rt-qPCR après un traitement des myotubes C2C12 avec du palmitate et la figure 3C montre que, contrairement à ce qu'on s'attendait, le palmitate induit une augmentation par 3 des ARNm de la SMS1. Ce résultat suggère que la production de SM à partir de céramides n'est pas bloquée au niveau de la réaction catalysée par la SMS1.



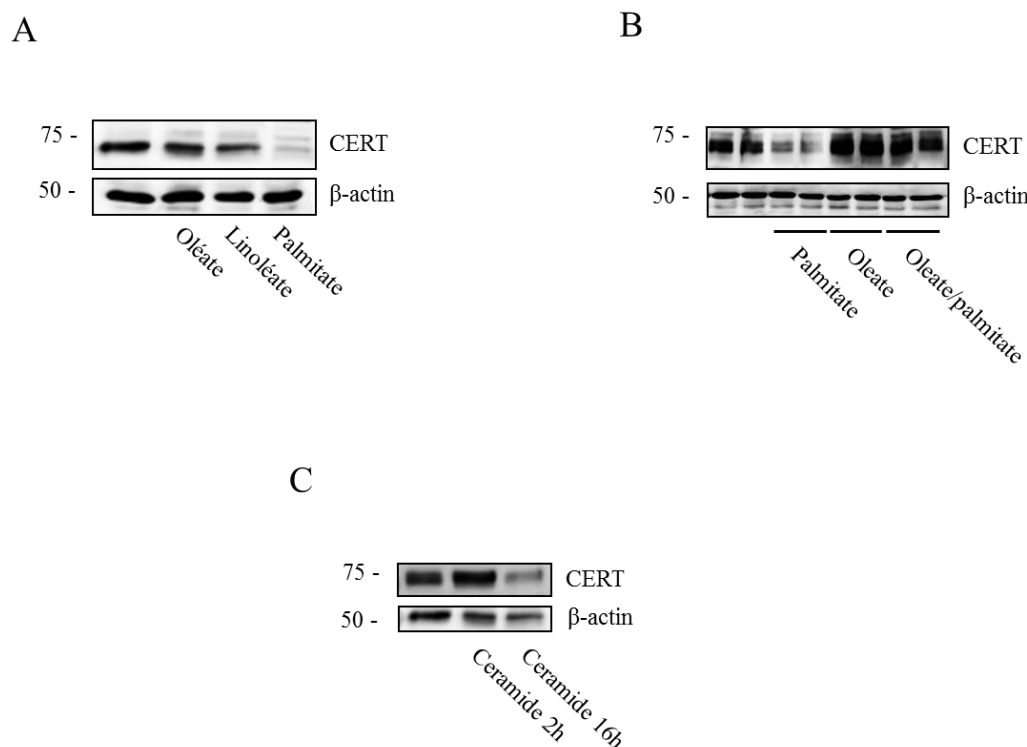
**Figure 3 : Expression des ARNm de CERT et de la SMS1 dans des conditions lipotoxiques.**

(A) Quantification des ARNm de CERT provenant de muscle de souris contrôles ou nourries sur régime hyperlipidique par qRT-PCR. (B) Quantification des ARNm de CERT provenant de muscle de souris contrôles ou ob/ob par qRT-PCR. (C) Les myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate (0,75mM) pendant 16h avant extraction des ARNm. Quantification des ARNm de CERT par qRT-PCR. (D) Les myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate (0,75mM) pendant 16h avant extraction des ARNm. Quantification des ARNm de la SMS1 par qRT-PCR. \* désigne une différence significative ( $p < 0.05$ ) comparée aux cellules non traitées contrôles.

*Les acides gras insaturés n'affectent pas l'expression de CERT dans les cellules musculaires C2C12.*

Il a été postulé que le type d'acides gras libres, saturés ou insaturés, est critique dans le développement de la résistance à l'insuline. En effet, si les acides gras saturés induisent une insulino-résistance (Hunnicut et al., 1994; Vessby et al., 2001), les acides gras insaturés n'ont pas d'effet délétère et protègent même les cellules de l'action négative des acides gras saturés (Ryan et al., 2000; Dimopoulos et al., 2006; Coll et al., 2006; Sabin et al., 2007). Afin de montrer si les acides gras insaturés peuvent exercer un effet protecteur sur l'expression de CERT en présence de palmitate, des myotubes C2C12 ont été incubés avec du palmitate (0,75mM), de l'oléate ou du linoléate (0,3mM). La figure 4A montre que si le palmitate altère l'expression de CERT, les 2 autres types d'acides gras n'ont aucun effet (figure 4A). Plus intéressant, le traitement des myotubes avec de l'oléate et du palmitate protège les cellules contre l'effet néfaste de ce dernier sur l'expression de CERT (figure 4B).

Pour décrypter si le palmitate altère l'expression de CERT *via* les céramides produites, les myotubes C2C12 ont été traités directement avec des C2-céramides (céramides à chaîne courte qui traversent la membrane plasmique par simple diffusion) pendant 2h (50µM) ou 16h (20µM). Les myotubes incubés pour une courte durée avec les céramides ont une expression de CERT inchangée alors qu'après 16h d'incubation, l'expression de CERT est diminuée (figure 4C). Ces résultats suggèrent que le palmitate altère l'expression de CERT *via* la production de céramides.





**Figure 4: Effets des acides gras insaturés et des céramides sur l'expression de CERT dans les myotubes C2C12.**

(A, B) Les myotubes C2C12 ont été traité avec du palmitate (0,75mM), de l'oléate (0,3mM) ou du linoléate (0,3mM) pendant 16h avant lyse des cellules. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membranes de nitrocellulose. Ces dernières ont été ensuite incubées avec des anticorps dirigés contre la protéine CERT et la  $\beta$ -actine. (C). Les myotubes C2C12 ont été traité avec des C2-céramides (100 $\mu$ M ; 2h, ou 50 $\mu$ M ; 16h). Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membranes de nitrocellulose. Ces dernières ont été ensuite incubées avec des anticorps dirigés contre la protéine CERT et la  $\beta$ -actine.

**Effet du palmitate sur la phosphorylation de CERT : implication de la protéine kinase D.**

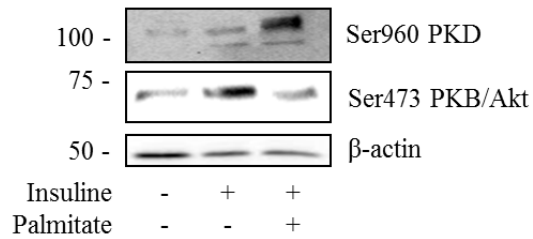
L'activité de CERT est connue pour être régulée négativement par la phosphorylation de son résidu Ser132 par la protéine kinase D (PKD). La PKD contient deux domaines riches en cystéines qui se lient au diacyl glycérol, un domaine PH qui remplit une fonction auto-inhibitrice, et un domaine kinasique. La PKD est activée par phosphorylation de son résidu Ser 960 en réponse à différents stress (Franz-Wachtel et al., 2012). Cette kinase est localisée dans le cytosol, le noyau, le Golgi, et dans la membrane plasmique, où elle régule divers processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, le trafic des vésicules, et les réponses cellulaires immunitaires (Wakana et al., 2012). Il a été montré que la phosphorylation de la sérine 132 de CERT par la PKD diminue l'affinité de CERT pour le phosphatidylinositol 4-phosphate au niveau du Golgi, réduisant ainsi l'activité de transfert des céramides par CERT (Fugmann et al., 2007b). Ainsi, l'interdépendance de la PKD avec CERT est cruciale pour le maintien du transport des céramides du RE vers le Golgi.

La figure 5A montre que, dans les myotubes C2C12, le palmitate induit la phosphorylation de PKD sur son résidu sérine 960. De plus, le palmitate induit la phosphorylation de CERT sur son résidu sérine 132 parallèlement à sa diminution d'expression protéique (figure 5B).

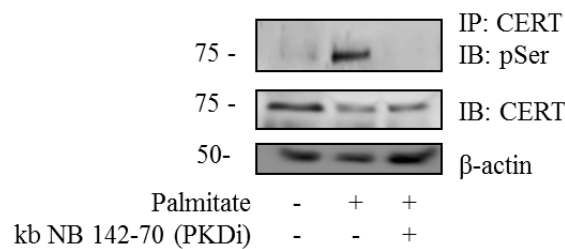
La perte de phosphorylation de CERT en réponse au palmitate dans des cellules traitées avec un inhibiteur de la PKD, le kb NB 142-70 (figure 5B), démontre que la sérine 132 est la cible de la PKD en présence du lipide.

Tous ces résultats montrent que CERT est régulé négativement au niveau de son expression, mais aussi de son activité dans des conditions lipotoxiques.

A



B



**Figure 5 : Effet du palmitate sur la phosphorylation de la PKD et de CERT dans des myotubes C2C12.**

(A) Les myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate (0,75mM) pendant 16h, puis avec de l'insuline (100nM) pendant 10min avant d'être lysés. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membranes de nitrocellulose. Ces dernières ont été ensuite incubées avec des anticorps dirigés contre le résidu Ser960 de la PKD, Ser473 de la PKB/Akt et la  $\beta$ -actine. (B) Les myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate (0,75mM) pendant 16h puis lysés. CERT est ensuite immunoprécipité et les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière est ensuite incubée avec des anticorps dirigés contre les protéines phosphorylées sur un résidu sérine, CERT et la  $\beta$ -actin

#### *Le stress RE et le protéasome ne relaient pas l'action du palmitate sur l'expression de CERT*

Nous avons montré précédemment que le palmitate pourrait induire un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les cellules musculaires (Hage Hassan. et al., 2012). Cependant, si l'activation de ce dernier entraîne une insulino-résistance dans les hépatocytes in vitro (Lim et al., 2009), l'équipe a montré récemment qu'il ne joue pas de rôle dans la progression de l'insulino-résistance musculaire (Hage Hassan. et al., 2012). Il est donc improbable que le stress du RE induit par le palmitate relaie l'action du lipide sur l'expression de CERT. Pour le vérifier, nous avons traité les cellules C2C12 avec du palmitate pendant 16h en présence ou non d'acide tauroursodesoxycholique (TUDCA), une chaperonne chimique qui inhibe le stress du RE (Miller et al., 2007) ou du 4-PBA (l'acide 4-phényl butyrique) qui inhibe aussi le stress RE en stabilisant la structure des protéines. Nous avons utilisé aussi la tunicamycine (un

inducteur chimique du stress RE en inhibant la N-glycosylation des protéines) comme contrôle positif d'une activation du stress du RE).

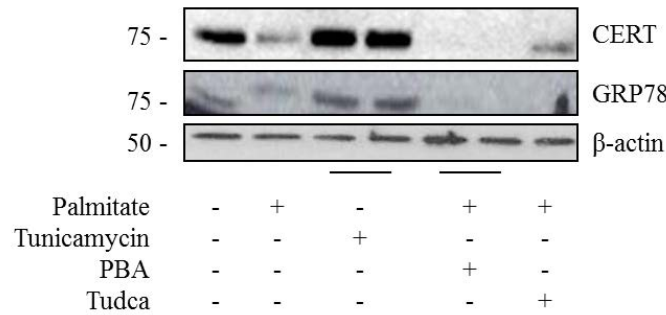
La figure 6A montre que la protéine chaperonne GRP78, marqueur d'un stress du RE, est fortement induite en présence de tunicamycine, alors que le palmitate n'induit que très légèrement son expression (figure 6A). Cependant, l'expression de CERT n'est altérée qu'en présence de palmitate et l'inhibition du stress du RE en présence de TUDCA ou de PBA n'empêche pas le lipide de diminuer d'expression de CERT dans les myotubes C2C12 (figure 6A).

Ces résultats montrent que le stress RE, activé par le palmitate, ne joue pas de rôle dans la diminution d'expression de CERT observée en présence du lipide.

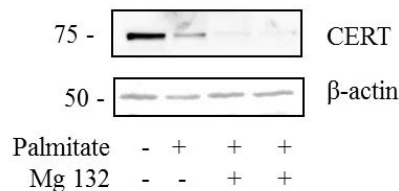
Un autre mécanisme impliqué pourrait être une dégradation de CERT par le protéasome. Le protéasome joue un rôle majeur dans la plupart des processus biologiques, notamment au travers de la dégradation régulée de protéines régulatrices (Zhou et al., 2007). Cette voie de dégradation était à être évaluée même si son activation en réponse au palmitate dans les cellules musculaires est sujette à débat (Yang et al., 2013). Nous avons donc traité des cellules C2C12 avec du palmitate pendant 16h en présence ou non de MG132, un inhibiteur spécifique du protéasome cellulaire.

La figure 6B montre que le traitement des cellules avec le MG132 n'a aucun impact antagoniste de l'action inhibitrice du palmitate sur l'expression de CERT.

A



B



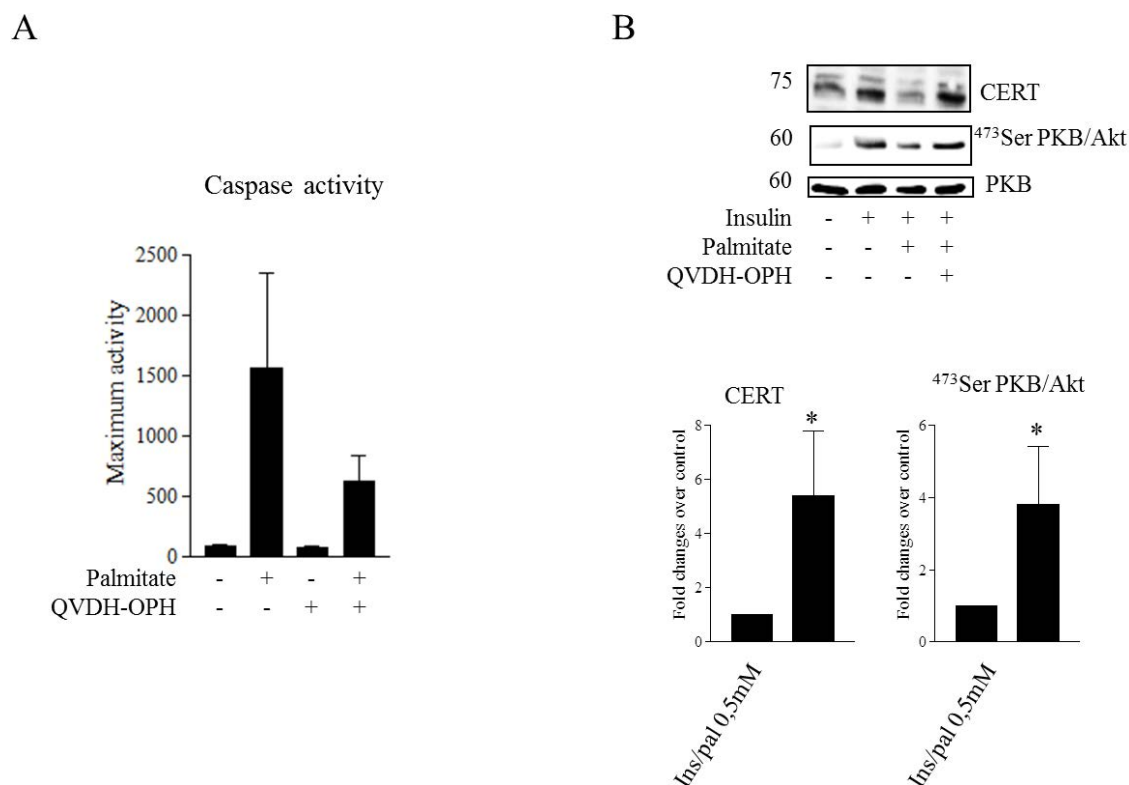
**Figure 6 : Implication du stress du réticulum ou du protéasome dans la régulation de l'expression de CERT dans des conditions lipotoxiques.**

(A) Les myotubes C2C12 ont été traité avec de la tunicamycine (0,5µg/ml) ou du palmitate (0,75mM) pendant 16h, en présence ou non de PBA (5mM) ou de tudca (1mM) avant d'être lysés. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membranes de nitrocellulose. Ces dernières ont été ensuite incubées avec des anticorps dirigés contre la protéine CERT, GRP78 et la β-actine. (B) les myotubes C2C12 ont été traité avec du palmitate (0,75 mM), en présence ou non de Mg 132 (1µM) avant d'être lysés. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose. Cette dernière a été ensuite incubée avec des anticorps dirigés contre CERT et la β-actine.

#### *Altération de l'expression de CERT : un mécanisme caspase-dépendant.*

Afin de décrypter le mécanisme régulant l'expression de CERT en réponse au palmitate dans les cellules musculaires, notre équipe s'est intéressée à l'action des caspases. En effet, une étude récente a montré que CERT pouvait être clivé par l'intermédiaire de 3 caspases (2, 3 et 9) durant un stress pro-apoptotique induit par le TNFα dans des cellules HeLa, résultant à une perte de fonction de CERT et une diminution de la synthèse *de novo* de sphingomyéline dans le Golgi (Chandran and Machamer, 2012b). Nous nous sommes donc demandé si un mécanisme similaire pouvait intervenir dans nos cellules musculaires en réponse au palmitate. Pour tester cette hypothèse, nous avons traité des cellules musculaires avec du palmitate pendant 16h en présence ou absence d'un inhibiteur large des caspases, le QVDH-OPH qui inhibe les caspases 3,7 et 9 (Caserta et al., 2003). La figure 7 montre que le palmitate active

l'activité des caspases 3 et 7 (figure 7A) et inhibe l'expression de CERT (figure 7B) dans les myotubes C2C12, entraînant une perte de la réponse insulínique (diminution de la phosphorylation de la PKB/Akt en réponse à l'hormone) (figure 7B). Cependant, le QVDH-OPH qui bloque l'activité caspase en présence de palmitate (figure 7A), empêche l'altération de l'expression de CERT en réponse au palmitate (figure 7B), et restaure le signal insulínique induisant la phosphorylation de la PKB/Akt (figure 7B).



**Figure 7 : Implication des caspases dans la régulation de l'expression de CERT et de la sensibilité à l'insuline dans les myotubes C2C12 en présence de palmitate.**

Les myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate (0,75mM) pendant 16h en présence ou non de Q-VD-Oph non-o-methylated (20μM). (A) L'activité des caspases 3/7 a été mesurée à l'aide du kit Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay. (B) Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose. Cette dernière a été ensuite incubée avec des anticorps dirigés contre CERT, le résidu Ser473 de la PKB/Akt et la β-actine.

#### *Influence de la modulation d'expression de CERT sur la sensibilité à l'insuline musculaire.*

Les résultats décrits plus haut indiquent que la régulation de l'expression de CERT par le palmitate pourrait jouer un rôle critique dans les effets délétères des acides gras saturés dans

les cellules musculaires, en empêchant la biosynthèse des SM à partir des céramides dans les conditions lipotoxiques.

L'étape suivante a donc été d'essayer de déterminer si une chute d'expression fonctionnelle de CERT provoquée artificiellement joue un rôle dans la perte de sensibilité à l'insuline des cellules en présence d'excès lipidique.

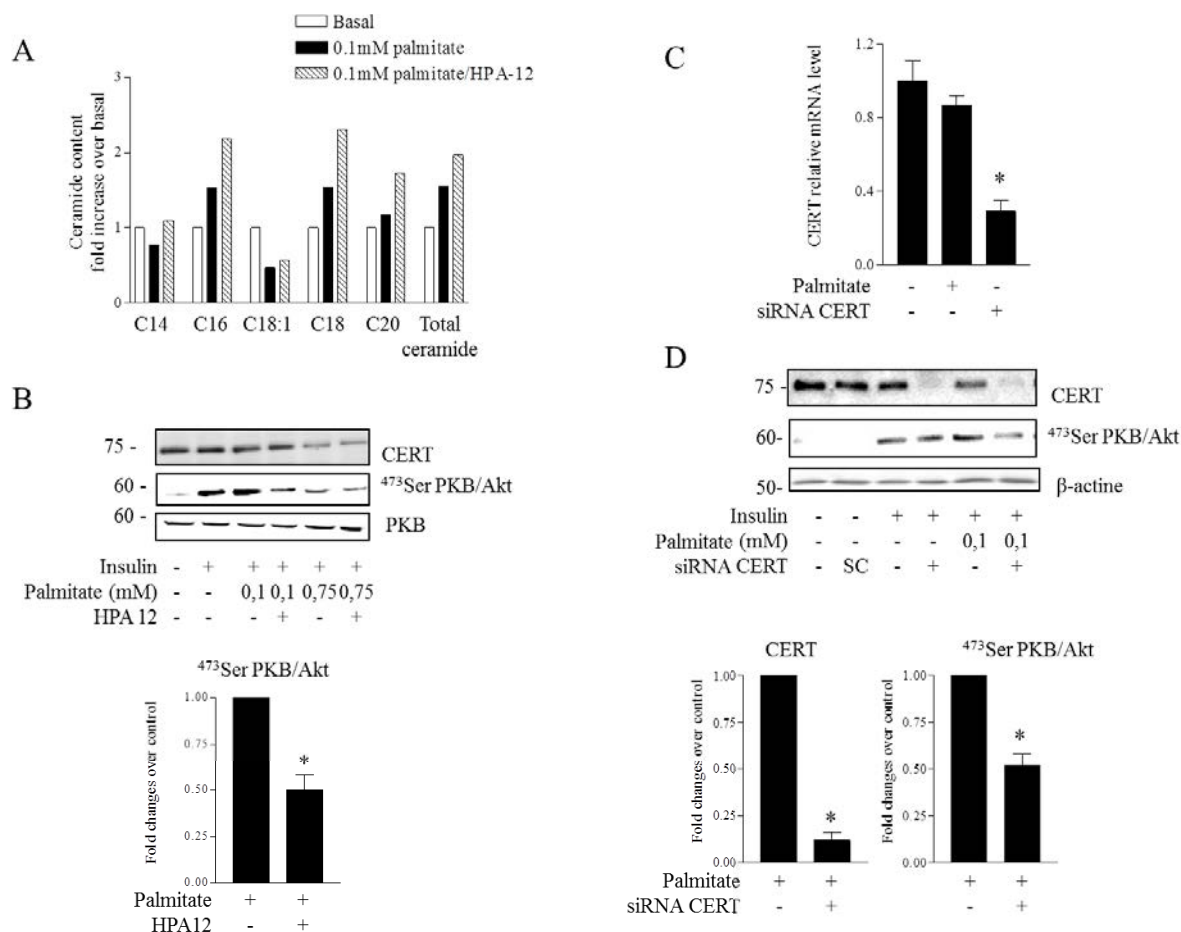
Nous avons inhibé l'expression de CERT dans les cellules musculaires avec l'aide d'un siRNA dirigé contre CERT ou d'un inhibiteur de CERT, le (SM).*N*-(3-Hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl) dodecanamide (HPA12), synthétisé par l'équipe de Berkes, Bratislava, Slovaquie). Le HPA12 agit comme un analogue compétitif des céramides (Yasuda et al., 2001) et empêche les céramides d'être transportées par CERT (Duris et al., 2011).

La figure 8A montre que le palmitate à 0,1mM induit une faible biosynthèse des espèces de céramides normalement transportées par CERT du RE vers le Golgi (C16, C18 :1, C18 et C20) (Kumagai et al., 2005; Hanada et al., 2007b). A cette faible concentration, le palmitate n'a aucun effet négatif sur l'expression de CERT et n'inhibe pas la phosphorylation de la PKB/Akt en réponse à l'insuline (figure 8B). De manière intéressante, en présence de HPA12, le palmitate à 0,1mM semble produire plus de céramides (figure 8A), suggérant que le HPA12 a bien inhibé CERT et empêche les céramides produites dans le RE en réponse au palmitate d'être métabolisées en SM dans le Golgi. L'inhibition du transport des céramides du RE vers le Golgi en présence du HPA12 potentialise donc l'action inhibitrice du palmitate sur la phosphorylation de la PKB en réponse à l'insuline (figure 8B).

A 0,75mM, par contre, l'effet du palmitate sur CERT est maximum (faible expression de CERT, figure 8B), et l'HPA12 ne potentialise plus l'action délétère du lipide sur la PKB/Akt (figure 8B).

Pour confirmer l'importance d'effet néfaste de la diminution de l'expression de CERT sur la sensibilité à l'insuline dans les cellules musculaire C2C12, nous avons inhibé l'expression de CERT à l'aide d'un ARN interférant dirigé contre CERT. Nous avons ensuite incubé les cellules transfectées avec l'ARN interférant avec du palmitate (0,1mM) pendant 16h. La figure 8C montre que, contrairement au palmitate, l'ARN interférant dirigé contre CERT a bien induit la dégradation des ARNm de CERT dans les myotubes C2C12. La figure 8D montre qu'à 0,1mM, le palmitate n'induit qu'une légère diminution de l'expression de CERT, sans effet notable sur la phosphorylation de la PKB/Akt. Par contre, dans les cellules transfectées avec l'ARN interférant dirigé contre CERT, nous observons une absence totale d'expression de CERT associée à aussi une potentialisation de l'action du palmitate sur la

PKB/Akt, ce qui confirme que l'absence d'expression de CERT potentialise l'action du palmitate sur la PKB/Akt en empêchant les céramides d'être métabolisées en SM (figure 8D).

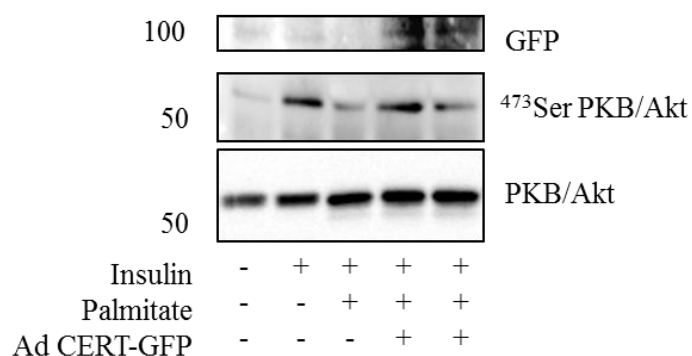


**Figure 8 : Effet de la modulation de l'activité/expression de CERT sur la sensibilité à l'insuline dans les myotubes C2C12 en présence de palmitate.**

(A) Les myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate (0,1mM) pendant 16h en présence ou non d' HPA 12 (10μM). Les lipides ont été ensuite extraits et les différentes espèces de céramides quantifiées par spectrométrie de masse. (B) Les myotubes C2C12 ont été traités avec du palmitate (0,1mM) pendant 16h en présence ou non d' HPA 12 (10μM), puis avec de l'insuline (100nM) pendant 10min avant d'être lysés. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose. Cette dernière a été ensuite incubée avec des anticorps dirigés contre CERT, le résidu Ser473 de la PKB/Akt et la PKB/Akt totale. (C) Les myotubes C2C12 ont été transfectés avec un siRNA CERT (5μM, 72h) ou un siRNA contrôle sc (5μM, 72h), puis traités avec du palmitate (0,5mM) pendant 16h avant extraction des ARN totaux. Les ARNm de CERT ont été ensuite quantifiés par qRT-PCR. (D) Les myotubes C2C12 ont été transfectés avec un siRNA CERT (5μM, 72h) ou un siRNA contrôle sc (5μM, 72h), puis traités avec du palmitate (0,5mM) pendant 16h et de l'insuline (100nM) pendant 10min. Les cellules ont été lysées, les protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose. Cette dernière a été ensuite incubée avec des anticorps dirigés contre CERT, le résidu Ser473 de la PKB/Akt et la β-actine.

Pour confirmer l'importance de l'expression de CERT dans le maintien de la sensibilité à l'insuline dans des conditions lipotoxiques, nous avons surexprimé CERT dans des myotubes C2C12 en utilisant un adénovirus produisant CERT et nous avons traité ensuite les cellules avec du palmitate (0,75mM) pendant 16h. La figure 9 montre que CERT (fusionné avec la green fluorescente protein, GFP) est bien surexprimé dans nos cellules. De plus, la surexpression de CERT empêche les céramides produits en réponse au palmitate d'inhiber la phosphorylation de la PKB/Akt sur ses deux sites Thr308 et Ser473 normalement induite en réponse à l'insuline (figure 9).

Ces résultats confirment donc l'importance du transport des céramides du RE vers le Golgi, et d'empêcher leur accumulation dans le RE.



**Figure 9 : Effet de la surexpression de CERT sur la sensibilité à l'insuline dans les myotubes C2C12 en présence de palmitate.**

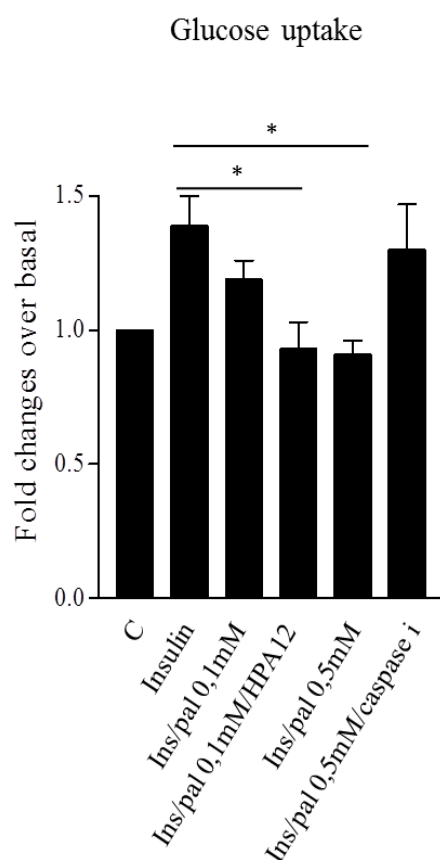
Les myotubes C2C12 ont été infectés avec un adénovirus exprimant la protéine de fusion CERT-GFP, puis traités avec du palmitate (0,75mM) pendant 16h, suivi d'un pulse d'insuline en fin d'incubation (100nM, 10min). Les cellules ont été lysées, les protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose. Cette dernière est ensuite incubée avec des anticorps dirigés contre la GFP, le résidu Ser473 de la PKB/Akt et la  $\beta$ -actine.

Enfin, évaluer si les modifications d'expression de CERT dans des conditions lipotoxiques avait des conséquences physiopathologiques, nous avons mesuré le transport de glucose dans des myotubes C2C12 pré-traités avec le HPA12 (inhibe l'activité de CERT) ou bien avec le Q-VD-Oph (inhibiteur de caspases), puis ensuite avec du palmitate pendant 16h.

La figure 10 montre que l'insuline induit une augmentation de 40% du transport de glucose dans les myotubes C2C12. Cette stimulation est complètement perdue quand les cellules sont pré-traitées avec du palmitate à 0,5mM.



Si à 0,1mM, le palmitate n'a aucun effet significatif sur le transport de glucose insulino-stimulé (figure 10), en présence de HPA12, l'action du palmitate à 0,1mM est aggravée et ce dernier inhibe la stimulation du transport de glucose par l'insuline (figure 10). Ce résultat confirme l'effet potentialisateur du HPA12 sur l'action du palmitate à 0,1mM sur la voie insulinique (figure 8B). A l'inverse, l'inhibiteur de caspase Q-VD-Oph empêche le palmitate à 0,5mM d'inhiber le transport de glucose insulino-stimulé (figure 10), confirmant ainsi l'importance d'une expression optimale de CERT pour empêcher l'action délétère des céramides sur la voie insulinique.



**Figure 10 : Mesure du transport de glucose dans les myotubes C2C12 en présence de palmitate.**

Les myotubes C2C12 ont été traité avec du palmitate (0,1mM ou 0,5mM) pendant 16h en présence ou non de HPA-12 (10 $\mu$ M) ou de QVD-Oph (20 $\mu$ M). Le transport de glucose a été mesuré traitement des cellules avec de l'insuline (100nM) pendant 30min. Les résultats sont la moyenne de 5 expériences différentes.\* différence significative par rapport aux cellules contrôles non traitées.

## Discussion

Nous avons mis en évidence l'existence d'une voie métabolique qui pourrait être importante pour empêcher les céramides de s'accumuler dans les cellules dans des conditions lipotoxiques. En effet, la conversion des céramides en SM pourrait être une étape clef pour contrer l'action délétère des céramides sur la voie insulinaire car une approche métabolomique récente a montré l'existence de nombreux métabolites circulants dont une augmentation ou une diminution d'expression pouvait être indépendamment prédictive d'un diabète (Floegel et al., 2013). De manière singulière, les SM appartiennent à la seconde catégorie et pourraient donc être des candidats intéressants en clinique pour essayer d'identifier des individus à risque, dans le but de retarder ou même prévenir le début de la maladie. Au vu de ces données, les mécanismes impliqués dans les variations intracellulaires de SM sont donc d'autant plus importants à comprendre.

Nous avons mis en évidence dans les cellules musculaires un défaut de transport des céramides du RE vers le Golgi. Ce défaut est la conséquence d'une altération de l'expression/activité de CERT, protéine impliquée dans ce transport. En effet, dans des conditions lipotoxiques, l'expression de CERT, mais aussi son activité, sont très fortement réduites et l'accumulation de céramides dans le RE qui en découle participe sûrement au mécanisme qui inhibe la voie insulinaire, car si on les pousse vers le Golgi en surexprimant CERT, on rétablit la sensibilité à l'insuline des cellules en présence d'excès d'acides gras. Ces données suggèrent donc que CERT joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme sphingolipidique dans des conditions lipotoxiques.

Les variations d'expression de CERT observées dans cette étude ne sont pas sans précédent. En effet, une étude a montré dans la lignée cancéreuse HeLa qu'un stress pro-apoptotique (induit par le  $\text{TNF}\alpha$ ) pouvait aussi avoir comme conséquence une inactivation de CERT via son clivage par les caspases (Chandran and Machamer, 2012b). Comme dans notre étude, le défaut de transport des céramides observé a pour conséquence une diminution de biosynthèse des sphingomyélines (Chandran and Machamer, 2012b).

Contrairement à CERT, le palmitate induit une augmentation des ARNm de la SMS1, enzyme qui catalyse la transformation des céramides en SM au niveau du Golgi. Ce résultat peut paraître un peu étrange car le palmitate induit une diminution des concentrations de SM dans les cellules (Hu et al., 2011). Cependant, cette contre-régulation intervient peut-être pour

que, dans des conditions lipotoxiques, la cellule essaye de maintenir des concentrations de SM stables, même quand les concentrations de céramides dans le Golgi sont diminuées.

Il semble qu'un défaut de biosynthèse des SM ait des conséquences néfastes non seulement sur la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires mais aussi au niveau pancréatique. En effet, chez des souris SMS1 KO, il a été montré qu'une perte de synthèse de SM entraîne une hyperglycémie associée à une inhibition des cellules bêta pancréatiques pour sécréter de l'insuline (Yano et al., 2011b). Les auteurs ont montré que, comme dans les cellules musculaires, l'accumulation de céramides dans les cellules bêta pancréatiques est délétère et conduit à l'apparition d'un stress oxydant et à des défauts de sécrétion d'insuline (Yano et al., 2011b).

En plus de la SMS, une autre enzyme, la sphingomyélinase (SMase), joue un rôle très important dans la régulation de la balance céramide/SM dans les cellules. La SMase transforme des SM en céramide et son expression est augmentée chez des patients insulino-résistants (Strackowski et al., 2007b; Pralhada et al., 2013). De plus, une étude récente montre que l'inhibition de la SMase dans les cellules musculaires empêche l'action délétère du palmitate sur la sensibilité à l'insuline (Verma et al., 2014), confirmant donc l'importance de la régulation de l'axe céramide/SM pour le maintien d'une sensibilité à l'insuline optimale.

Comme les SM produites dans le Golgi, celles synthétisées au niveau des membranes à partir de céramides via la SMS2 semblent tout aussi importante quant à la régulation du métabolisme glucido-lipidique des cellules. En effet, Mitsutake et coll. (2011) ont révélé que la SMS2 était associée au transporteur lipidique CD36/FAT et à la cavéoline-1 (Mitsutake et al., 2011b). La cavéoline-1 est un composant structural majeur de microdomaines spécifiques appelés cavéoles et ces dernières jouent un rôle majeur dans l'entrée des lipides et des nutriments *via* une endocytose cavéolaire dépendante (Doherty and McMahon, 2009), qui conduit à la maturation des gouttelettes lipidiques (Farese, Jr. and Walther, 2009). L'activité de la SMS2, qui régule les concentrations membranaires de céramides et de SM, module donc l'environnement lipidique et la fonction de ces cavéoles. De façon surprenante, Mitsutake et coll. (2011) ont montré qu'une absence de SMS2 (donc une diminution de production de SM membranaire) chez des souris nourries avec un régime hyperlipidique induit un changement structural de la membrane plasmique et empêche l'apparition d'une obésité et d'une insulino-résistance (Mitsutake et al., 2011b). Ces résultats montrent, qu'au contraire des SM produites dans le Golgi via la SMS1, celles synthétisées dans les membranes plasmiques sont

plutôt délétères dans un environnement lipotoxique et elles favorisent l'entrée des lipides dans les cellules via une endocytose cavéolaire.

En résumé, notre étude met en évidence que l'intégrité du transport des céramides du RE vers le Golgi pour y être transformées en SM est altérée dans des conditions lipotoxiques et que son rétablissement artificiel empêche les céramides de s'accumuler dans le RE et ainsi d'agir négativement sur la voie de signalisation insulinaire.

L'élucidation complète de la régulation de CERT en réponse à un excès d'acides gras nous permettra peut-être l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, préalable au développement de molécules susceptibles de combattre le diabète de type 2.

A plus long terme, l'équipe veut développer des peptides inhibiteurs capable d'empêcher l'interaction d'une ou des caspases avec le site de clivage présent dans la protéine CERT. De plus, nous voudrions développer des souris surexprimant CERT spécifiquement dans les cellules musculaires. Dans l'optique de valider nos résultats *in vivo*, nous avons développé un mutant de la protéine CERT non phosphorylable par la PKD en mutant la sérine-132 de CERT en alanine (CERT-S132A) et des travaux futurs de surexpression de ce mutant constitutivement actif directement dans le muscle de souris nourries avec un régime hyperlipidique sont à envisager. De même, notre équipe est en cours d'inhiber l'activité de CERT en utilisant le HPA-12 chez des souris hyperlipidiques et de suivre le degré d'altération de la sensibilité musculaire à l'insuline.

## Reference List

- Blair,A.S., Hajduch,E., Litherland,G.J., and Hundal,H.S. (1999). Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **274**, 36293-36299.
- Blouin,C.M., Prado,C., Takane,K.K., Lasnier,F., Garcia-Ocana,A., Ferre,P., Dugail,I., and Hajduch,E. (2010). Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* **59**, 600-610.
- Caserta,T.M., Smith,A.N., Gultice,A.D., Reedy,M.A., and Brown,T.L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis*. **8**, 345-352.
- Chandran,S. and Machamer,C.E. (2012). Inactivation of ceramide transfer protein during pro-apoptotic stress by Golgi disassembly and caspase cleavage. *Biochem. J.* **442**, 391-401.
- Coll,T., Jove,M., Rodriguez-Calvo,R., Eyre,E., Palomer,X., Sanchez,R.M., Merlos,M., Laguna,J.C., and Vazquez-Carrera,M. (2006). Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* **55**, 2779-2787.
- Dimopoulos,N., Watson,M., Sakamoto,K., and Hundal,H.S. (2006). Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem. J.* **399**, 473-481.
- Doherty,G.J. and McMahon,H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857-902.
- Duris,A., Wiesenganger,T., Moravcikova,D., Baran,P., Kozisek,J., Daich,A., and Berkes,D. (2011). Expedient and practical synthesis of CERT-dependent ceramide trafficking inhibitor HPA-12 and its analogues. *Org. Lett.* **13**, 1642-1645.
- Farese,R.V., Jr. and Walther,T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* **139**, 855-860.
- Floegel,A., Stefan,N., Yu,Z., Muhlenbruch,K., Drogan,D., Joost,H.G., Fritsche,A., Haring,H.U., Hrabe de,A.M., Peters,A., Roden,M., Prehn,C., Wang-Sattler,R., Illig,T., Schulze,M.B., Adamski,J., Boeing,H., and Pischon,T. (2013). Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* **62**, 639-648.
- Franz-Wachtel,M., Eisler,S.A., Krug,K., Wahl,S., Carpy,A., Nordheim,A., Pfizenmaier,K., Hausser,A., and Macek,B. (2012). Global detection of protein kinase D-dependent phosphorylation events in nocodazole-treated human cells. *Mol. Cell Proteomics.* **11**, 160-170.
- Fugmann,T., Hausser,A., Schoffler,P., Schmid,S., Pfizenmaier,K., and Olayioye,M.A. (2007). Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J. Cell Biol.* **178**, 15-22.
- Hage Hassan, Hainault,I., Vilquin,J.T., Samama,C., Lasnier,F., Ferre,P., Foufelle,F., and Hajduch,E. (2012). Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* **55**, 204-214.

Hage Hassan., Hainault,I., Vilquin,J.T., Samama,C., Lasnier,F., Ferre,P., Fougelle,F., and Hajduch,E. (2012). Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55, 204-214.

Hajduch,E., Balendran,A., Batty,I.H., Litherland,G.J., Blair,A.S., Downes,C.P., and Hundal,H.S. (2001). Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia* 44, 173-183.

Hajduch,E., Turban,S., Le,L., X, Le,L.S., Lipina,C., Dimopoulos,N., Dugail,I., and Hundal,H.S. (2008). Targeting of PKC $\zeta$  and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem. J.* 410, 369-379.

Hanada,K. (2014). Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 704-719.

Hanada,K., Kumagai,K., Tomishige,N., and Kawano,M. (2007). CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 644-653.

Hu,W., Ross,J., Geng,T., Brice,S.E., and Cowart,L.A. (2011). Differential regulation of dihydroceramide desaturase by palmitate versus monounsaturated fatty acids: implications for insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 286, 16596-16605.

Hunnicut,J.W., Hardy,R.W., Williford,J., and McDonald,J.M. (1994). Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Diabetes* 43, 540-545.

Kumagai,K., Yasuda,S., Okemoto,K., Nishijima,M., Kobayashi,S., and Hanada,K. (2005). CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J. Biol. Chem.* 280, 6488-6495.

Lim,J.H., Lee,H.J., Ho,J.M., and Song,J. (2009). Coupling mitochondrial dysfunction to endoplasmic reticulum stress response: a molecular mechanism leading to hepatic insulin resistance. *Cell Signal.* 21, 169-177.

Mahfouz,R., Khoury,R., Blachnio-Zabielska,A., Turban,S., Loiseau,N., Lipina,C., Stretton,C., Bourron,O., Ferre,P., Fougelle,F., Hundal,H.S., and Hajduch,E. (2014). Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight. *PLoS. One.* 9, e101865.

Marks,D.L., Bittman,R., and Pagano,R.E. (2008). Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells. *Histochem. Cell Biol.* 130, 819-832.

Miller,S.D., Greene,C.M., McLean,C., Lawless,M.W., Taggart,C.C., O'Neill,S.J., and McElvaney,N.G. (2007). Tauroursodeoxycholic acid inhibits apoptosis induced by Z alpha-1 antitrypsin via inhibition of Bad. *Hepatology* 46, 496-503.

Mitsutake,S., Zama,K., Yokota,H., Yoshida,T., Tanaka,M., Mitsui,M., Ikawa,M., Okabe,M., Tanaka,Y., Yamashita,T., Takemoto,H., Okazaki,T., Watanabe,K., and Igarashi,Y. (2011). Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* 286, 28544-28555.

Powell,D.J., Hajduch,E., Kular,G., and Hundal,H.S. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKC $\zeta$ -dependent mechanism. *Mol. Cell Biol.* 23, 7794-7808.

- Powell,D.J., Turban,S., Gray,A., Hajduch,E., and Hundal,H.S. (2004). Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C $\zeta$  activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem. J.* 382, 619-629.
- Pralhada,R.R., Vaidyanathan,N., Rengasamy,M., Mammen,O.A., Somaiya,N., and Jagannath,M.R. (2013). Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *J. Lipids* 2013, 178910.
- Ryan,M., McInerney,D., Owens,D., Collins,P., Johnson,A., and Tomkin,G.H. (2000). Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. *QJM.* 93, 85-91.
- Sabin,M.A., Stewart,C.E., Crowne,E.C., Turner,S.J., Hunt,L.P., Welsh,G.I., Grohmann,M.J., Holly,J.M., and Shield,J.P. (2007). Fatty acid-induced defects in insulin signalling, in myotubes derived from children, are related to ceramide production from palmitate rather than the accumulation of intramyocellular lipid. *J. Cell Physiol* 211, 244-252.
- Schmitz-Peiffer,C., Craig,D.L., and Biden,T.J. (1999). Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J. Biol. Chem.* 274, 24202-24210.
- Spiegel,S., Foster,D., and Kolesnick,R. (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 159-167.
- Strackowski,M., Kowalska,I., Baranowski,M., Nikolajuk,A., Otziomek,E., Zabielski,P., Adamska,A., Blachnio,A., Gorski,J., and Gorska,M. (2007). Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 2366-2373.
- Summers,S.A., Garza,L.A., Zhou,H., and Birnbaum,M.J. (1998). Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell Biol.* 18, 5457-5464.
- Summers,S.A. and Nelson,D.H. (2005). A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome. *Diabetes* 54, 591-602.
- Verma,M.K., Yateesh,A.N., Neelima,K., Pawar,N., Sandhya,K., Poornima,J., Lakshmi,M.N., Yogeshwari,S., Pallavi,P.M., Oommen,A.M., Somesh,B.P., and Jagannath,M.R. (2014). Inhibition of neutral sphingomyelinases in skeletal muscle attenuates fatty-acid induced defects in metabolism and stress. *Springerplus.* 3, 255.
- Vessby,B., Uusitupa,M., Hermansen,K., Riccardi,G., Rivellese,A.A., Tapsell,L.C., Nansen,C., Berglund,L., Louheranta,A., Rasmussen,B.M., Calvert,G.D., Maffetone,A., Pedersen,E., Gustafsson,I.B., and Storlien,L.H. (2001). Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 44, 312-319.
- Vilquin,J.T., Marolleau,J.P., Sacconi,S., Garcin,I., Lacassagne,M.N., Robert,I., Ternaux,B., Bouazza,B., Larghero,J., and Desnuelle,C. (2005). Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther.* 12, 1651-1662.
- Wakana,Y., van,G.J., Meissner,F., Scarpa,M., Polishchuk,R.S., Mann,M., and Malhotra,V. (2012). A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *EMBO J.* 31, 3976-3990.

Wang,C.N., O'Brien,L., and Brindley,D.N. (1998). Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 47, 24-31.

Yang,M., Wei,D., Mo,C., Zhang,J., Wang,X., Han,X., Wang,Z., and Xiao,H. (2013). Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit myokine genes in C2C12 myotubes. *Lipids Health Dis.* 12, 104.

Yano,M., Watanabe,K., Yamamoto,T., Ikeda,K., Senokuchi,T., Lu,M., Kadomatsu,T., Tsukano,H., Ikawa,M., Okabe,M., Yamaoka,S., Okazaki,T., Umehara,H., Gotoh,T., Song,W.J., Node,K., Taguchi,R., Yamagata,K., and Oike,Y. (2011). Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. *J. Biol. Chem.* 286, 3992-4002.

Yasuda,S., Kitagawa,H., Ueno,M., Ishitani,H., Fukasawa,M., Nishijima,M., Kobayashi,S., and Hanada,K. (2001). A novel inhibitor of ceramide trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of sphingomyelin synthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 43994-44002.

Zhou,Q., Du,J., Hu,Z., Walsh,K., and Wang,X.H. (2007). Evidence for adipose-muscle cross talk: opposing regulation of muscle proteolysis by adiponectin and Fatty acids. *Endocrinology* 148, 5696-5705.



## **DISCUSSION**

Notre société moderne et active a un besoin essentiel, manger vite. La restauration rapide satisfait ce besoin et leurs services répondent bien aux attentes de cette clientèle active et pressée. D'où la notion du Fast-food qui vient remplacer peu à peu l'alimentation traditionnelle et équilibrée. Parmi les conséquences de ce mode de nutrition, deux aspects physiopathologiques se sont installés au sein de notre société : l'obésité et le DT2. En effet, la consommation mal contrôlée de cette nourriture riche en acides gras saturés (majoritairement le palmitate) augmente le risque de stockage dans les cellules non-adipocytaires d'un dérivé lipidique appelé céramides. Les céramides sont connus pour altérer le métabolisme glucidique au niveau des tissus insulino-sensibles comme le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux. Vu que le muscle squelettique constitue un tissu majeur pour le captage glucidique durant les périodes post prandiales, évitant ainsi les hyperglycémies, une altération à ce niveau pourrait avoir des conséquences importantes comme une insulino-résistance, qui à long terme laisse place au DT2.

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la lutte contre l'insulino-résistance musculaire, qui n'est pas une pathologie en tant que telle, mais plutôt la conséquence d'une gluco-lipotoxicité environnementale. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents relayant l'action délétère des céramides est de première urgence.

Les céramides sont produits par 3 voies : la voie *de novo* qui s'effectue dans le RE et utilise le palmitoyl-CoA comme substrat, la voie des sphingomyélinases à partir des SM au niveau de la membrane plasmique et la voie de recyclage à partir de sphingolipides complexes dans les lysosomes.

Dans des conditions lipotoxiques, les deux premières voies sont majoritairement stimulées.

Il a été montré que dans ces conditions, l'expression de certaines enzymes de la voie *de novo* (SPT, CerS) (Futerman and Riezman, 2005; Futerman, 2006) est augmentée et que leur inhibition *in vitro* (SPT), ou *in vivo* (DES1) prévient largement les effets de la lipotoxicité sur la sensibilité à l'insuline (Miklosz et al., 2013; Holland et al., 2007). Des études ont aussi mis en évidence l'augmentation de l'expression de la nSMase2 membranaire (enzyme clef de la voie des sphingomyélinases) chez des rongeurs et des patients insulino-résistants (Strackowski et al., 2007). De plus, l'expression de la nSMase 2 est augmentée *in vitro* en réponse au palmitate (Verma et al., 2014) ou à des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  (Kim et al., 2008; Ito et al., 2009). Dans cette étude, l'inhibition artificielle des SMase à l'aide du GW4869 protège les cellules musculaires C2C12 de l'insulino-résistance induite par le palmitate (Verma et al., 2014).

n'avait été avancée pour essayer d'expliquer les différences mécanistiques observées entre les deux lignées musculaires. Toutes deux se différencient en myotubes quand les concentrations en sérum du milieu de culture sont diminuées et semblent partager des caractéristiques musculaires semblables.

Cependant, il y a quelques années, notre groupe avait remarqué que l'activation de l'un ou l'autre mécanisme était dépendant de la structure membranaire des cellules (Blouin et al., 2010a). En effet, dans des cellules comme les adipocytes qui possèdent une membrane plasmique très riche en cavéoles où les céramides s'accumulent et se concentrent, c'est le mécanisme « PKC atypique » qui prévaut pour inhiber la PKB/Akt (Blouin et al., 2010a). Par contre, dans des cellules pauvres en cavéoles (fibroblastes), les céramides sont moins présentes au niveau de la membrane plasmique et leur accumulation subcellulaire différente dans des conditions lipotoxiques implique qu'elles inhibent la PKB/Akt en la déphosphorylant par l'intermédiaire de la phosphatase PP2A (Blouin et al., 2010a).

Dans la première étude de ma thèse, nous avons émis l'hypothèse qu'une différence de concentration en cavéoles des membranes des myotubes C2C12 par rapports aux membranes de myotubes L6 pourrait expliquer les différentes voies utilisés par les céramides pour inhiber la signalisation insulinique dans les deux modèles cellulaires. Nos résultats montrent que c'est le cas, les myotubes C2C12 exprimant beaucoup moins de cavéoles que les myotubes L6. Parallèlement, beaucoup moins de céramides s'accumulent au niveau de la membrane plasmique dans les myotubes C2C12 que dans les myotubes L6. Ces résultats expliquent donc le fait que les céramides agissent négativement majoritairement *via* l'activation de la PP2A dans les myotubes C2C12, alors que dans les myotubes L6, riches en cavéoles, les céramides activent les PKC atypiques qui séquestrent la PKB/Akt au niveau des cavéoles.

Les résultats de mon étude indiquent donc que, dans les cellules musculaires, les concentrations cavéolaires membranaires des myotubes dictent en parti la localisation subcellulaire des céramides et leur mode d'action (activation des PKC atypiques ou de la PP2A) sur la voie de signalisation insulinique.

Qu'en est-il dans des « vrais » myotubes comme les myotubes humains ?

Pour répondre à cette question nous avons mis en culture des cellules satellites humaines obtenues après dissociation par de la collagénase de biopsies de muscles de sujets contrôles. Ces biopsies ont été obtenues *via* une collaboration avec le Dr Jean-Thomas Vilquin qui travaille à l'Institut de Myologie (la Pitié Salpêtrière, Paris). L'intérêt de ces cellules musculaires humaines mises en culture par rapport à l'utilisation directe de biopsies musculaires est leur facilité de traitement par différents effecteurs. Par contre, leur point faible

est que les cellules sont entretenues dans un environnement différent de celui rencontré chez l'organisme vivant, les interactions tissu-tissu et tissu-organisme étant inexistantes. Cependant, il faut noter que les cellules musculaires humaines en culture répondent à l'insuline de façon identique à ce qui est observé dans les myotubes L6 et C2C12.

Après traitement des myotubes humains avec du palmitate, nous avons été les premiers à mettre en évidence que les céramides ainsi produites induisent une perte de réponse des cellules à l'insuline *via* l'activation de la PKC $\delta$ , l'inactivation de la voie « PP2A » ne contrecarrant pas l'action négative des dérivés lipidiques sur la voie insulinique. Nos résultats montrent donc que c'est la voie activant les PKC atypiques qui prédomine dans des myotubes humains.

De façon intéressante, nous avons confirmé la dominance de cette voie sur celle impliquant la PP2A dans des myotubes humains en traitant des myotubes humains en culture provenant d'amputations de jambes de patients diabétiques (obtenues en collaboration avec le Dr Olivier Bourron, La Pitié Salpêtrière). Nous avons montré que le traitement de ces myotubes avec du Ro 81-3220 (inhibiteur des PKCs) reversait l'insulino-résistance des cellules, l'inhibition de la voie impliquant la PP2A n'ayant aucun effet.

Les résultats de cette étude montrent donc pour la première fois que dans des « vrais » myotubes humains, les céramides produites dans des conditions lipotoxiques inhibent la voie de signalisation insulinique *via* l'activation des PKC atypiques. Bien sûr, ces résultats obtenus *ex vivo* sont quand même sujet à caution et il faudrait les confirmer en travaillant directement sur des explants de muscle humain, sains ou diabétiques en essayant de regarder une co-localisation éventuelle de la PKB/Akt et des PKC atypiques au niveau des cavéoles membranaires.

Néanmoins, au vu de ces résultats, la question suivante est de savoir si les protéines activées par les céramides pour inhiber la voie de signalisation insulinique pourraient servir de cibles thérapeutiques dans l'objectif de contrecarrer l'action délétère des céramides. La réponse est sûrement négative concernant les PKC atypiques car ces dernières sont impliquées dans la régulation de nombreuses autres voies de signalisation intracellulaires comme celle régulant la translocation des vésicules contenant GLUT4 et l'activation du captage du glucose (Farese, 2002; Farese et al., 2007; Liu et al., 2010), mais aussi dans la régulation de la transduction du signal mitogénique (Berra et al., 1993) et de l'activation du facteur nucléaire NF-Kappa B (Diaz-Meco et al., 1993).

Il semble donc que la seule façon de combattre l'action des céramides serait d'empêcher leur accumulation cellulaire. Deux possibilités existent pour arriver à ce résultat : (i) en bloquant la/les voies de biosynthèse des céramides ou (ii) en poussant le métabolisme des céramides vers d'autres dérivés sphingolipidiques moins nocifs.

La première possibilité semble la plus facile à réaliser vu que de nombreux inhibiteurs de la voie de biosynthèse *de novo* des céramides sont déjà disponibles commercialement. Cependant, une étude du groupe de Summers (Holland et al., 2007) a montré les limites de cette approche. En effet, ils ont généré des souris pour lesquelles le gène codant pour la dihydroceramide désaturase 1 (DES-1), enzyme désaturant les dihydrocéramides pour donner les céramides (Schulze et al., 2000). Mises sous dexaméthasone pour induire une insulino-résistance, ces souris ne produisent pas de céramides et sont beaucoup moins insulino-résistantes que des souris contrôles dans les mêmes conditions. Cependant, les souris DES-1 KO présentent des retards de croissance majeurs, de nombreuses anomalies physiologiques et meurent 8 à 10 jours après leur naissance (Holland et al., 2007).

En conclusion, bloquer complètement la voie de biosynthèse *de novo* des céramides a un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline des animaux sous régime lipotoxique mais les tue à court terme, l'absence complète de synthèse de céramide (et des dérivés sphingolipidiques qui en découlent) étant surement très délétère, aussi bien au niveau des structures membranaires des cellules que pour la transduction de nombreux signaux intracellulaires.

Agir sur la production de certaines espèces de céramides pourrait, peut-être, être une solution alternative. En effet, il a été montré que les espèces de céramides ont des fonctions différentes selon la longueur de la chaîne acyl qu'ils possèdent et agir sur les enzymes (CerS) responsables de la N-acylation des céramides pourrait être une solution.

Turpin et col (2014) ont mis en évidence une corrélation très forte dans le tissu adipeux entre l'expression de CerS6 et de son produit majoritaire, les C16-céramides, et les niveaux d'insulino-résistance chez des patients humains. Des résultats similaires ont été aussi observés dans le tissu adipeux et le foie de souris nourries avec un régime hyper lipidique. L'utilisation de souris CerS6 KO a ensuite permis de mettre en évidence d'un rôle crucial de CerS6 comme régulateur de l'homéostasie glucidique des animaux *via* la modulation de la  $\beta$ -oxydation dans le tissu adipeux et le foie (Turpin et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés par Raichur et col (2014) qui ont utilisé des souris déficientes pour CerS2 (qui produit principalement des céramides à long chaînes, C22/24/24 :1). Chez ces souris, ils ont observé une augmentation compensatoire spectaculaire des concentrations intracellulaires en C16-céramides dans le foie

qui prédisposent les animaux à une stéato-hépatite et une insulino-résistance (Raichur et al., 2014).

Par contre, dans les deux études citées plus haut, aucune conséquence métabolique n'a été observée au niveau musculaire. Serait-il possible qu'une autre espèce de céramide soit responsable de l'insulino-résistance musculaire ?

L'étude de Bajpeyi et col (2013) a montré que les concentrations des espèces de céramides C16-, C18- et C24- étaient augmentées dans les cellules musculaires de patients diabétiques par rapport à des cellules musculaires de sujets contrôles (Bajpeyi et al., 2014). De façon similaire, nous avons montré que les concentrations en C16-, C18- et C28-céramides étaient augmentées dans nos myotubes humains traités avec du palmitate (Mahfouz et al., 2014b). Ces résultats posent peut-être l'hypothèse que les céramides C16 ne sont pas responsables de l'insulino-résistance musculaire et qu'il faudrait mieux se pencher sur les CerS (CerS1, CerS4) qui produisent les C18, C20 ou C24-céramides.

La deuxième possibilité Le résultat de l'activation de ces voies dans des conditions lipotoxiques est une augmentation massive de la production intracellulaire d'espèces de céramides.

L'implication des céramides dans l'insulinorésistance musculaire a été de nombreuses fois mise en évidence. En effet, une augmentation intramusculaire de céramides a été observée dans différents modèles d'insulinorésistance chez les rongeurs (souris génétiquement obèses ob/ob ; souris rendues insulinorésistantes suite à un régime hyperlipidique ou à un bolus lipidique), et chez des patients diabétiques comparés à des sujets sains (Holland and Summers, 2008; Yang et al., 2009; Ussher et al., 2010). Ces observations ont été confirmés *in vitro* dans des cellules musculaires traités avec du palmitate (Powell et al., 2004a; Schmitz-Peiffer et al., 1999a) ou directement avec des céramides (Hajduch et al., 2001; Summers et al., 1998).

Au niveau musculaire, la majorité des études menées pour décrypter le mécanisme d'action des céramides sur la voie insulinique ont été réalisées dans deux lignées murines. La première appelée C2C12 est une lignée myoblastique dérivée de cellules satellites de souris alors que la seconde appelée L6 dérive de cellules satellites de rat. De façon étrange, deux voies d'action des céramides distinctes ont été mises en évidence en utilisant ces deux lignées de myotubes.

Dans les myotubes C2C12, les céramides activent la phosphatase PP2A qui déphosphoryle la PKB/Akt (Chavez and Summers, 2003; Salinas et al., 2000; Cazzolli et al., 2001). Par contre, dans les myotubes L6, les céramides inhibent l'activité de la PKB/Akt via l'activation de PKC atypiques (Hajduch et al., 2001 ; Stratford et al., 2001).

Jusqu'à maintenant, aucune explication offerte pour essayer de contrecarrer l'action délétère des céramides au niveau musculaire pourrait être d'étudier la régulation de leur devenir métabolique. En effet, une fois synthétisés, les céramides sont ensuite convertis en d'autres dérivés sphingolipidiques plus complexes comme les SM, la S1P et la céramide-1-phosphate (voir introduction). De manière intéressante, les SM ont été montrés comme relayant des effets contraires à ceux observés avec les céramides.

Concernant les SM, les céramides doivent être transportés dans l'appareil de Golgi où réside la SMS1 pour y être métabolisés et plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré une corrélation inverse entre les concentrations de SM et le développement de l'insulinorésistance (Hu et al., 2011; Yano et al., 2011a). De plus, chez des souris SMS1 KO, il a été montré qu'une perte de synthèse de SM entraîne une hyperglycémie associée à une inhibition de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques (Yano et al., 2011). Une autre enzyme, la sphingomyélinase (SMase), joue un rôle très important dans la régulation de la balance céramide/SM dans les cellules. La SMase transforme les SM en céramides et son expression est augmentée chez des patients diabétiques insulinorésistants (Pralhada et al., 2013). Une étude récente montre que l'inhibition de la SMase dans les cellules musculaires empêche l'action délétère du palmitate sur la sensibilité à l'insuline (Verma et al., 2014), confirmant donc l'importance de la régulation de l'axe céramide/SM pour le maintien d'une sensibilité à l'insuline optimale.

Dans ce contexte, le transport des céramides synthétisés dans le RE vers le Golgi pour y être transformés en SM, est une étape cruciale pour pouvoir contrôler le devenir des deux sphingolipides.

Dans la deuxième partie de mon travail, je me suis intéressée à l'étude de la protéine responsable du trafic intracellulaire des céramides entre le RE et le Golgi dans des conditions lipotoxiques. Deux types de transport existent entre le RE et le Golgi. Le premier est vésiculaire, permettant le transport des céramides à chaîne longue ( $C > 20$ ) destinés à produire principalement des glucosylcéramides. Le deuxième est une protéine qui s'appelle CERT (pour CERamide Transporteur) et qui transporte les céramides à chaînes plus courtes (-C14, -C16, -C18, et -C20) pour donner des SM. La sélectivité en substrat de CERT est la

conséquence de la structure (taille et forme) de la cavité hydrophobique du transporteur, définissant la longueur des céramides qu'il peut transporter (Kudo et al., 2008).

Des études *in vitro* montrent que CERT pourrait aussi transporter des DAG (dont la structure n'est pas très éloignée de celle des céramides) du golgi vers le RE pour servir de précurseur à la synthèse de TAG (Bishop and Bell, 1988). Cependant, la régulation du transport des DAG *via* CERT dans des conditions physiologiques n'est pas encore claire et n'a pas été démontré *in vivo*.

Dans notre étude, nous avons observé une altération post-traductionnelle de l'expression du transporteur des céramides CERT dans plusieurs modèles de lipotoxicité. Nous avons montré dans les cellules musculaires que CERT est à la fois une cible de la PKD qui régule son activité par phosphorylation et une cible des caspases qui régulent son expression.

Nous avons mis en évidence qu'une inhibition artificielle (inhibiteur et siRNA) de l'expression de CERT potentialisait l'effet délétère du palmitate sur la voie de signalisation insulinique et, qu'au contraire, la surexpression de CERT dans des conditions lipotoxiques sensibilisaient les cellules à l'insuline en présence de palmitate.

La question qui se pose à la suite de ces résultats est comment les céramides qui s'accumulent dans le RE altèrent-ils la signalisation insulinique ? Dans ma première étude, j'ai montré que les céramides s'accumulaient dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique appelés cavéoles. Notre hypothèse serait que les céramides qui s'accumulent dans le RE pourraient être transférés au niveau de la membrane plasmique des cellules *via* des jonctions existant ou apparaissant entre le RE et la membrane plasmique. L'existence de telles jonctions a déjà été mise en évidence. Il est connu que le RE peut former des contacts dynamiques avec plusieurs autres organelles et membranes, incluant la membrane plasmique, et que ces contacts jouer un rôle dans le transport de lipides et dans la signalisation cellulaire (Manford et al., 2012; Stefan et al., 2013).

Dans des cellules musculaires, des tubules du RE forment des associations étroites avec la membrane plasmique des cellules qui sont importantes pour l'induction de contractions dépendantes du calcium (Carrasco and Meyer, 2011). Ces jonctions fournissent des liens de communication directe entre le RE et la membrane plasmique. Serait-il possible qu'un flux de céramides passe du RE vers la membrane plasmique via ce type de jonction inter-organelle ? La réponse à cette question pourrait nous aider à mieux comprendre une accumulation de céramides dans le RE agit sur la signalisation insulinique et pourrait peut-être nous fournir des éléments pour essayer de contrecarrer leur action.



Ces résultats de ma deuxième étude sont encore préliminaires et nécessitent bien sûr une approche plus *in vivo* pour être vraiment validés. Nous envisageons donc deux approches : une à court terme en surexprimant CERT par électrotransfert dans le muscle de souris (en collaboration avec A. Sotiropoulos, Institut Cochin) préalablement nourries sous régime standard ou avec un régime hyper lipidique, puis traitées avec un bolus d'insuline avant sacrifice. Grâce à cette technique nous espérons pouvoir suivre la phosphorylation de différents acteurs de la voie insulinique dans les muscles par immunofluorescence.

Notre deuxième approche sera à plus long terme et consistera à développer une souris transgénique surexprimant CERT spécifiquement dans les muscles squelettiques. Quand nous les posséderons, nous nourrirons ces souris avec un régime hyper lipidique pour les rendre insulino-résistantes et nous mesurerons leur sensibilité à l'insuline par l'intermédiaire d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique couplé par une mesure de captage de 2-désoxyglucose afin d'évaluer spécifiquement la sensibilité à l'insuline musculaire. Le captage du glucose et la mesure du contenu en glycogène seront aussi mesurés dans des muscles isolés. En parallèle, nous déterminerons (i) le contenu en différentes espèces de céramides, et (ii) l'activité de la voie de signalisation insulinique dans ces muscles isolés.

Une autre stratégie que l'on pourrait utiliser pour empêcher les acides gras saturés de cibler et de dégrader CERT *via* l'activation de caspases serait d'utiliser des petits peptides qui cibleraient les sites de liaison des caspases sur CERT. Une étude a montré qu'il était possible d'inhiber spécifiquement l'activation de différents groupes de caspases par l'intermédiaire de peptides aldéhydes qui empêchent leur activation par clivage (Garcia-Calvo et al., 1998). Plusieurs inhibiteurs de caspase ont déjà été utilisés dans différents modèles animaux d'accident vasculaire cérébral, de maladie du foie, et de lésion cérébrale traumatique (Yakovlev et al., 1997; Rouquet et al., 1996; Loddick et al., 1996; Hara et al., 1997; Rodriguez et al., 1996; Yaoita et al., 1998).

Tous ces projets nous permettent peut-être de mieux définir l'importance de CERT dans le maintien d'une bonne régulation du métabolisme glucidique dans les muscles.

Nous espérons que les résultats de ma thèse, ainsi que les études planifiées pour le futur, permettront d'ouvrir de nouvelles perspectives pour lutter contre le développement d'une résistance à l'insuline des tissus périphériques en réponse aux excès d'acides gras en comprenant mieux les mécanismes intracellulaires mis en jeu lors d'une exposition chronique des cellules musculaires aux céramides. Ces informations seront précieuses pour

essayer de contrôler le développement de l'insulinorésistance dans les cellules musculaires et le diabète de type 2. Elles pourraient permettre notamment l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, préalable au développement de molécules susceptibles de combattre le diabète de type 2.

# **ANNEXES**

## **Targeting sphingolipid metabolism in the treatment of obesity/type 2 diabetes**

Lara Bellini<sup>1,\*</sup>, Mélanie Campana<sup>1,\*</sup>, Rana Mahfouz<sup>2,3,4</sup>, Aurélie Carlier<sup>2,3,4</sup>, Julien Véret<sup>1</sup>, Christophe Magnan<sup>1</sup>, Eric Hajduch<sup>2,3,4</sup> and Hervé Le Stunff<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité Biologie Fonctionnelle et Adaptative – UMR CNRS 8251, Université PARIS-DIDEROT (7), 4, rue Marie-Andrée Lagroua Weill-Halle, 75205 PARIS Cedex 13 France

<sup>2</sup>INSERM, UMR\_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France

<sup>3</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France

<sup>4</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR\_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France

\* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author :

Hervé Le Stunff

Unité Biologie Fonctionnelle et Adaptative - CNRS UMR 8251

Équipe Régulation de la glycémie par le système nerveux central (REGLYS)

Université PARIS- DIDEROT (7)

4, rue Marie-Andrée Lagroua Weill-Halle

75205 PARIS Cedex 13

France

Tél: 01 57 27 77 97

Fax: 01 57 27 77 96

Email: [herve.le-stunff@univ-paris-diderot.fr](mailto:herve.le-stunff@univ-paris-diderot.fr)

<http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/>

## Targeting sphingolipid metabolism in the treatment of obesity/type 2 diabetes

### Abstract

**Introduction:** Obesity is the major correlated factor linked to the development of type II diabetes (T2D). Excess of circulating fatty acids (FA), which characterizes obesity, induce insulin resistance, steatosis but also  $\beta$  cells dysfunction and apoptosis. These deleterious effects have been defined under the term lipotoxicity.

**Areas covered:** FA are metabolized into different lipid species, among which ceramides play a crucial role on lipotoxicity. The action of ceramides on tissues, such as muscle, liver, adipose tissue and pancreatic  $\beta$  cells, during the development of T2D will be reviewed. Then, the potential antagonist action of other sphingolipids, namely sphingoid base phosphates, on lipotoxicity in skeletal muscle and  $\beta$  cells will be discussed.

**Expert opinion:** Ceramide is a critical mediator for the development of T2D linked to obesity. Targeting proteins involved in ceramide's deleterious action remains not possible since their involvement in many other intracellular signaling pathways. A possibility to counteract ceramide action, would be to prevent the accumulation of the specific ceramide species involved in both insulin resistance and  $\beta$  cell apoptosis/dysfunction. Another possibility would be to adjust the dynamic balance between ceramide and sphingoid base phosphate, both acknowledged to display opposing properties on the development of T2D linked to obesity.

**Keywords:** apoptosis, ceramide, insulin, islet of Langerhans, lipotoxicity, liver, muscle, adipose tissue, obesity, pancreatic  $\beta$  cells, sphingolipids, sphingosine-1-phosphate, type 2 diabetes.

### Abbreviations:

AT: adipose tissue; ACC : acetyl-CoA carboxylase; CERK : ceramide kinase; CerS : ceramide synthases; CERT : ceramide transporter; CNS : Central nervous system; CPT-1 : palmitoyl-CoA transferase 1; DAG : Di-Acyl Glycerol; DEG1 : dihydroceramide desaturase; DH-Sph : dihydrosphingosine; ER : endoplasmic reticulum; HFD : high fat diet; LC-CoA : long chain acyl-CoA; FFA: Free Fatty Acid; NAFLD : nonalcoholic fatty liver disease; PDX-1 : pancreas-duodenum homeobox 1; PKC : Protein kinase C; SMS1 : sphingomyelin synthase 1; SMase : sphingomyelinases; SphK1 : sphingosine kinase 1; SphK2 : sphingosine kinase 2; SPT : serine palmitoyl-transferase; TAG : Triacylglyceride; T2D: type 2 diabetes; TLR : Toll Like Receptor; WAT : White adipose tissue; WT : wild-type



## 1- Introduction

### TYPE 2 DIABETES

In most of the developed and developing countries, type 2 diabetes (T2D) is one of the major causes of immature illness and death and imposes a substantial financial burden to society <sup>1</sup>. During diabetes, an imbalanced regulation of glucose levels occurs, resulting on a chronic and abnormal elevation of plasma glucose levels that leads to heart disease, kidney failure, limb amputation and blindness. In healthy people, the balance between glucose production and its utilisation is tightly controlled. The normo-glycemia is mainly maintained through the insulin secretion performed by the pancreatic  $\beta$  cells and inhibition of glucose production by the liver. The biological machinery of these cells enables to respond at threshold glucose circulating levels, releasing insulin when required. The insulin release decreases glucose level by two major actions: it increases the glucose uptake by tissues, mainly skeletal muscle, and it inhibits glucose release by the liver. The etiology of T2D is not well established but the pathophysiology of this disease is associated to both genetic and environmental factors, as well also the lifestyle, diet and obesity. To explain defects in both the insulin sensitivity and the insulin secretion observed in T2D, several mechanisms have been highlighted in the different tissues <sup>2,3</sup>.

### LIPOTOXICITY

Many evidences suggest that T2D is often associated with excessive levels of circulating lipids and abnormalities in lipid metabolism <sup>4</sup>. The WHO (World Health Organisation) showed that 44% of diabetic patient are also obese, suggesting a link between T2D and obesity. Prospective epidemiological studies performed in population with low or high risk to develop T2D showed that high free fatty acid (FFA) concentration in plasma are associated with the incidence of T2D <sup>5</sup>. Until 15 years ago, the "Randle cycle hypothesis" seemed the best explanation to understand the relationship between carbohydrate metabolism and lipid metabolism, particularly the deleterious role of fatty acids on the action of insulin on glucose metabolism in insulin sensitive tissues. In 1963, Philip Randle proposed the existence of a glucose / fatty acid cycle in cells that could play a crucial role in the development of diabetes <sup>6</sup>. Indeed, a substantial increase in FFA oxidation would result in an inhibition of hexokinase, leading to inhibition of glycolysis and to a rise of intracellular glucose in cells. In the 90s, new studies challenged this cycle. Unlike predicted by Randle, they showed that the accumulation of free fatty acids in muscle rather decreases intracellular glucose concentrations <sup>7</sup>. Obviously, it appears that the Randle cycle is only one of many mechanisms by which fatty acids can influence insulin action and glucose metabolism in insulin-sensitive tissues. FFA, in particular triglycerides, is the main energy source for cells and are used by tissues through the oxidative pathway. In normal conditions, the unconsumed fraction of FFA is stored into adipocytes within lipid droplets as energy reserve and is released in fasting conditions. However, a persistence of elevated levels of circulating FFA can lead to a saturation of the adipose tissue and to an ectopically storage of FFA in other peripheral tissues. Chronically elevated levels of FFA in circulation have been postulated to cause peripheral insulin resistance and impairment of insulin secretion by  $\beta$ -cells. This phenomenon has been defined as "lipotoxicity" <sup>8,9</sup>. Among the lipids that accumulate in these tissues, ceramides have been shown to play a critical role in mediating lipotoxicity.

In the present review, we will illustrate the mechanisms activated during lipotoxicity in different tissues, as muscle, liver, adipose tissue, pancreas and even the brain, with a special focus on the role of ceramides at the molecular, cellular and animal models. In addition, we will also present the role of other ceramide metabolites, such as sphingosine-1-phosphate (S1P), in the control of lipotoxicity. A better understanding of role of ceramide and its metabolism in lipotoxicity may allow the identification of pharmacological targets for the prevention and/or treatment of T2D associated to obesity.

## 2- Ceramides and lipotoxicity

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/eott> Email: [Claudia.Palmer@informa.com](mailto:Claudia.Palmer@informa.com)



It has been proposed that ceramides are important mediators of lipotoxicity<sup>8</sup>. In obesity, ceramides have been shown to accumulate in insulin-sensitive tissues and in pancreatic  $\beta$  cells<sup>10</sup>. Ceramide levels increase in both plasma and skeletal muscle of diabetic patients, as well as in liver, plasma, and muscle of obese mice<sup>11</sup>. In addition, a relationship between ceramide levels and insulin resistance has been clearly demonstrated *in vivo*<sup>11</sup>. In the context of obesity-associated fatty acid overload, ceramides are mainly produced *de novo* from saturated fatty acids (palmitate). This synthesis occurs in the endoplasmic reticulum (ER) (Figure 1) through different reactions that begin with the condensation of L-serine with palmitoyl-CoA by serine palmitoyl-transferase (SPT), generating 3-ketosphinganine, then reduced to form dihydrosphingosine (DH-Sph) via 3-ketosphinganine reductase. Sphinganine is then acylated by ceramide synthase (CerS) isoforms to form dihydroceramide (DH-Cer). In mammals, six CerS isoforms are expressed and are called CerS 1 to 6<sup>12</sup>. They carry out the same chemical reaction, but display distinct specificities for the acyl-CoA chain length they use for N-acylation (Figure 1). Thus, CerS isoforms are responsible for the fatty acid composition of ceramides. The chain base moiety of the lipid is finally desaturated by dihydroceramide desaturase (DES1) at the 4-5 position of the sphingoid base backbone to form ceramide. Once synthesized, ceramides can be transported to the Golgi apparatus<sup>13</sup> where they are converted into sphingomyelin by a sphingomyelin synthase or into glucosyl-ceramides through the glucosyl-ceramide synthase. The *de novo* synthesis pathway is not the only way to produce ceramide; another metabolic pathway involves the degradation of sphingomyelin into ceramide by sphingomyelinases and this process takes place in the lysosomal membrane and the cytoplasmic membrane<sup>14</sup>.

In this web of sphingolipid metabolism, ceramides are considered as central players in the synthesis of sphingolipids. Indeed, ceramides are the precursors of many lipid messengers. For example, ceramides can be metabolized into sphingosine which is in turn phosphorylated to yield sphingosine-1-phosphate (S1P)<sup>14</sup>.

### 2.1- Ceramides and muscle

During obesity, ceramide is the most toxic lipid that accumulates in muscle during obesity<sup>15,16</sup>. The association between increasing ceramide content in muscle and insulin resistance has been well demonstrated in muscles of both rodents and humans<sup>17-19</sup>. Inverse relationship between increased intramuscular ceramide content and insulin sensitivity has also been demonstrated *in vitro* by using exposing muscle cell lines to either saturated fatty acids (such as palmitate) or directly ceramide analogues<sup>20,21</sup>. Interestingly, studies have shown that, in human skeletal muscle, ceramide content was higher in type I than in type II fibers in patients with type 2 diabetes and in obese subjects<sup>22</sup>. The capacity to oxidize fat is higher in type I compared to type II muscle fibers, thus intracellular free fatty acid availability should be greater in type I muscle fibers. Since muscles of patients with type 2 diabetes contain 30% less mitochondria than normal subjects<sup>23</sup> higher *de novo* ceramide synthesis may be facilitated in these fibers.

A consensus now exists to say that protein kinase B (PKB/Akt) is ceramide's main target for inducing insulin resistance. PKB/Akt is an insulin signalling intermediate that plays a pivotal role in inducing the insulin-dependent uptake and utilization of glucose in insulin sensitive tissues<sup>21</sup>. Ceramides alter PKB/Akt in muscle cells via the two non-exclusive mechanisms. The first involves the activation of PP2A phosphatase (Figure 2). PP2A is a cytoplasmic serine/threonine phosphatase expressed ubiquitously. PP2A dephosphorylates many of substrates *in vitro* and is involved in the regulation of almost all cell activities. Ceramide-activated PP2A has been shown to prevent the activation of PKB/Akt in response to insulin through the dephosphorylation of both serine 473 and threonine 308 PKB/Akt sites<sup>18</sup>. Treatment of different cell types such as C2C12 muscle cell line, PC12 nerve cells and brown adipocytes with okadaic acid has demonstrated that PP2A mediates the negative action of ceramide on PKB/Akt in these cells<sup>24</sup>. The second mechanism involves a family of protein kinase Cs (PKCs)<sup>25</sup>, atypical PKCs which inhibit PKB/Akt translocation to the plasma membrane to be phosphorylated in response to insulin (Figure 2). This process depends on the activation of aPKCs by ceramides. Indeed, pharmacological inhibition aPKC activity prevents the



deleterious effect of ceramides on the activation of PKB/Akt by insulin in both adipocytes and L6 myotubes<sup>26</sup>. Ceramides directly activate aPKCs through a putative binding region<sup>27</sup>. It has been demonstrated in L6 myotubes that ceramide-activated aPKCs bind and phosphorylate PKB/Akt on a threonine 34/serine 34 residue (depending on PKB/Akt isoform) located the PH domain of the kinase, making impossible PI3K-produced PIP3 to bind it in response to insulin<sup>26</sup>. More recently, it has been shown that ceramides inhibit the activation of PKB/Akt by insulin via the activation of aPKCs in human myotubes<sup>19</sup>. Moreover, inhibition of aPKCs activation by ceramides in myotubes obtained from diabetic patients restore insulin signalling pathway in these cells<sup>19</sup>.

Why ceramides alter insulin signalling via two different mechanisms? The answer to this question maybe holds in membrane composition differences between the different cells studied. Indeed, it has been shown that ceramides induce the recruitment of PKC $\zeta$ -PKB/Akt complex in specific membrane areas called caveolin-enriched micro-domains (CEM)<sup>28</sup>. These lipid microdomains are special platforms that are at the origin of numerous signalling pathways<sup>29</sup>. These CEM are enriched with various sphingolipids (ceramides, sphingomyelins), cholesterol, but also in an important structural protein called caveolin<sup>29</sup>. Interestingly, caveolin can bind the aPKC<sup>30</sup> and it has been found that ceramides inactivate PKB/Akt by inducing the sequestration of the PKC $\zeta$ -PKB/Akt complex in CEM in these CEM-rich cells. In CEM-poor cell types, however, ceramides act negatively on PKB/Akt via PP2A<sup>31</sup>.

## 2.2- Ceramide and liver

The liver plays an important role in obesity-related insulin resistance, with excessive hepatic glucose production contributing to fasting hyperglycemia. Studies suggest that the liver is a key site for ceramide production<sup>32</sup>, but their contribution to the onset of insulin resistance is still on debate. While some studies found no real correlation between high hepatic ceramide levels and insulin sensitivity<sup>33</sup>, others demonstrated that high-fat diet-induced hepatic insulin resistance was reversed by inhibiting ceramide synthesis or by increasing ceramide degradation selectively in hepatocytes<sup>34</sup>. Liver-produced ceramides play also a role in the progression of hepatic steatosis. Indeed, blocking de novo ceramide synthesis using myriocin reduced high fat diet induced macrovesicular fat accumulation and hepatic triglyceride content<sup>35,36</sup>. These results were recently supported by a study using hepatic specific CerS6 knockout mice<sup>37</sup>. Reduced C16-ceramide content was observed in liver and mice were protected from diet-induced obesity and displayed an improved glucose tolerance<sup>37</sup>. Concomitantly, similar conclusions was obtained using CerS2 knockout mice. CerS2 is the dominant isoform in the liver and its disappearance led to an increase in C16-ceramide content in liver and conferred mice susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance<sup>38</sup>.

Interestingly, some studies suggest that hepatic ceramides could also indirectly act on other peripheral tissues (muscle, heart, and adipose tissue) after being secreted into the bloodstream. The liver is considered a primary source of plasma ceramides since in physiological conditions most of ceramides synthesized in the liver are excreted towards the circulation as components of very-low-density lipoproteins (VLDL) and low-density lipoproteins (LDL)<sup>39</sup>. Addition of palmitate to rat hepatocytes induces an increase in ceramide secretion, while incubation of hepatocytes with Fumonisin B1, inhibitor of ceramide synthase, reduced both sphingolipid synthesis and secretion by 90% without affecting the overall lipoprotein synthesis and the secretion of ApoB<sup>39</sup>. A study compared the levels of VLDL- and LDL-associated ceramides in obese patients with type 2 diabetes<sup>40</sup>. In this latter study, only LDL-containing ceramides were found to be elevated in blood of type 2 diabetic patients compared to lean insulin-sensitive individuals<sup>40</sup>. In agreement, treatment of cultured myotubes with LDL-containing C16- and/or C24-ceramides in vitro promoted insulin resistance in these cells, demonstrating that liver produced LDL-containing ceramides are deleterious for peripheral tissues<sup>40</sup>. Altogether, these data suggest that, in lipotoxic conditions, liver-produced ceramides are exported out of the liver mainly as LDL and affect glucose metabolism in other insulin-sensitive tissues. However, upon increased hepatic saturated fatty acid influx, as observed in insulin resistance state, the rate of increase in fatty acids exceed their secretion, resulting a progressive accumulation in ceramides in the liver, leading then to steatosis and insulin resistance.

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/eott> Email: [Claudia.Palmer@informa.com](mailto:Claudia.Palmer@informa.com)



In opposite to what has been described in muscle and adipocytes, ceramides do not seem to induce insulin resistance through direct inhibition of PKB/Akt in the liver. Indeed, a study from <sup>35</sup> has shown that ceramides inhibit insulin signalling through the activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) (Figure 2). Originally, PKR was identified as an interferon's induced kinase that responds to viral infection <sup>41</sup> to promote apoptosis <sup>42</sup>. Interestingly, PKR has been shown to be activated in liver of obese humans <sup>43</sup>. Yang et al 2010 <sup>44</sup> demonstrated in HepG2 hepatic cells that ceramide-induced PKR activation up-regulates the phosphorylation of IRS1 at Ser312, which in turn suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS1. The effect of PKR on IRS1 has been shown to be mediated by both JNK and IKK <sup>44</sup>. Since, the involvement of PKR in mediating lipid-induced insulin resistance has been reinforced recently by using PKR inhibitors in obese and diabetes mice (*ob/ob*). Moreover, it has been found that PKR inhibitors improved both insulin sensitivity and glucose intolerance in these mice <sup>45</sup>.

### 2.3- Ceramides and adipocytes

Studies have also demonstrated a key role of ceramide in adipocytes. Ceramide content is largely increased in adipose tissue of human obese diabetic patients and these lipid content correlates positively with HOMA-IR <sup>46</sup>. In addition, diet-induced obesity in mice is also associated with increased adipose tissue ceramide content and insulin resistance <sup>47</sup>. The involvement of ceramides in the onset of insulin resistance in adipocytes has been demonstrated in vitro by using both 3T3-L1 and human adipocytes. Treatment of these cells with ceramides analogues prevents completely insulin-induced glucose uptake through the inhibition of PKB/Akt <sup>31</sup>(Figure 2). Moreover, exposure to ceramide of 3T3-L1 adipocytes down-regulates mRNA expression of the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 <sup>48</sup>.

In adipocytes, and in opposite to liver and skeletal muscle, ceramide biosynthesis does not involve the *de novo* pathway <sup>20</sup>, but rather comes from sphingomyelin. Indeed, studies have shown that TNF $\alpha$  induces sphingomyelin hydrolysis through the activation of sphingomyelinases <sup>48</sup>. In fact, the *de novo* ceramide biosynthesis pathway is rather impaired in insulin resistance situations in white adipose tissue. This is due to a decreased in expression of the dihydroceramide desaturase (DES1), enzyme that converts inactive dehydroceramide into active ceramide <sup>49</sup>. Interestingly, adipocytes that do not express DES1 display impaired adipocyte differentiation and lipid accumulation <sup>49</sup>. As a consequence, in lipotoxic condition, adipocytes cannot buffer lipid excess efficiently, thus enhancing lipid uptake by other peripheral tissues such as liver and muscles.

As observed in muscle cells, PKB/Akt has also been found to be the main target of ceramide in adipocytes. Indeed, treatment of either 3T3-L1 adipocytes or human adipocytes with a short-chain ceramide analogue C2-ceramide blunts insulin-induced PKB/Akt activation, specifically through a mechanism involving aPKCs and sequestration of PKB/Akt into CEM.

### 2.4- Ceramide and pancreatic $\beta$ cells

Ceramide has an important role on  $\beta$  cell fate and function. Indeed, it has been demonstrated that ceramide analogues can induce apoptosis of  $\beta$  cells and islets of Langerhans in culture by blocking proliferation <sup>50</sup>. It also been show that *de novo* ceramide synthesis pathway is implicated on pancreatic  $\beta$  cell apoptosis <sup>8, 51</sup>. Interestingly, it has been shown that diminution of pancreatic  $\beta$  cell mass and loss of insulin secretion are correlated to an increase in intracellular ceramide levels and SPT expression in islet of Langerhans of obese Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. Lipotoxicity induces an accumulation of ceramides that is responsible for pancreatic  $\beta$  cell apoptosis through different pathways. Ceramide induced  $\beta$  cells apoptosis is mediated by ROS production and mitochondrial dysfunction <sup>50</sup>. Some data suggest that ceramide induced apoptosis through mitochondria injuries and subsequent ROS production <sup>52</sup>. It has also been proposed the same mechanism found on muscle cells,  $\beta$  cells apoptosis could be induced through the activation of PP2A and the subsequent dephosphorylation of PKB/Akt <sup>53</sup>. Endoplasmic reticulum stress has also been shown to be an important regulator of beta cell apoptosis in type 2 diabetes <sup>54</sup>. In agreement, the group of T. Biden have shown that ceramide mediated  $\beta$  cell apoptosis through the induction of ER stress <sup>55</sup>. In



mammals, several ceramide species exist. In pancreatic  $\beta$  cells, it appears that in consequence of the lipotoxicity, the levels of specific ceramide species are modified, specifically Cer-C18:0, Cer-C22:0 and Cer-C24:1<sup>51</sup>. The variety of ceramide species relies on an enzyme family, the ceramide synthases (CerS)<sup>13</sup>. This family is composed by six components of which each one have been identified to possess a characteristic substrate preference for particular fatty acyl-CoA. Interestingly,  $\beta$  cell lipotoxicity is associated with an augmentation of CerS4 expression, which has been found to play a critical role in pancreatic  $\beta$  cells apoptosis (Figure 3)<sup>51</sup>. However, the specific role of each ceramide species in  $\beta$  cells dysfunction induced by lipotoxicity remains to be clarified. Indeed, a recent study showed that CerS2 knock-out mice are unable to synthesize C22-C24 ceramide species and did not result in defective insulin secretion<sup>56</sup>. More recently, it has been shown that lipotoxicity could increase ceramide levels by affecting ceramide transport<sup>57</sup>. In mammals, there are two pathways are known by which ceramides are transported from the ER to the Golgi apparatus: a protein-mediated transport, by the soluble ceramide transfer protein CERT<sup>58</sup>, and a CERT-independent vesicular traffic<sup>14 57</sup>. Lipotoxicity has been shown to impair both vesicular- and CERT-mediated ceramide transport by decreasing of phospho-PKB/Akt levels which in turn possibly inhibits vesicular traffic, and by reducing the amount of active CERT (Figure 3)<sup>57</sup>. It remains now important to determine if this defect of ceramide transport contribute to  $\beta$  cell apoptosis induced by lipotoxicity.

Ceramide have also a critical role on insulin gene expression and could cause insulin secretion defects. Ceramide generated from lipotoxicity inhibits the insulin gene expression<sup>8</sup>. The mechanism involved on the insulin expression inhibition is not related to insulin mRNA instability, but to the inhibition of glucose induced insulin promoter activity<sup>59</sup>. This inhibition is associate with a decreased binding activity of the transcription factors MafA and pancreas-duodenum homeobox 1 (PDX-1)<sup>60</sup>. MafA is affected at the level of its expression, whereas PDX-1 is affected in its ability to translocate to the nucleus<sup>60</sup>. The mechanisms though which ceramide impairs PDX-1 subcellular localization and MafA expression are unknown, even if some studies have identified potential candidates. The c-jun NH2-terminal kinase JNK is known to be a target of ceramide<sup>61</sup> and can repress insulin gene expression via c-jun—dependent inhibition of E1-mediated transcription and via c-jun independent inhibition of PDX-1 binding<sup>62</sup>. Another study demonstrate that in islet of Langerhans and  $\beta$  cell line, ceramide dependent inhibition of the insulin gene expression is mediated by the dephosphorylation of protein kinases, ERK1/2 by PP2A<sup>63</sup>. The inhibition of insulin gene expression seems also to be correlated to the inhibition of the ceramidase, which increase the intercellular levels of ceramide<sup>63</sup>. Also the ceramide transport between ER and Golgi apparatus has been demonstrate to play a role on insulin gene expression, pharmacological inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) or down-regulation by siRNA of the ceramide transporter (CERT) increase dysfunction of pancreatic  $\beta$  cells induced by palmitate by affecting the binding of transcription factors to the insulin promoter<sup>64</sup>. Ceramide seems to act also at the insulin secretion level. In Yano's study, genetic deletion of SMS1 has been shown to induce accumulation of ceramide in islet of Langerhans, dysfunction of mitochondria and the subsequent inhibition of insulin secretion<sup>65</sup>. In this study, the ceramide accumulation affected mitochondria membrane integrity and induced an excessive production of ROS, which were partially responsible for the defect in insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells<sup>65</sup>. Taken together, these results suggest that ceramide accumulation, either through the reduced conversion into more complex sphingolipids or the induction of the *de novo* synthesis, is involved in pancreatic  $\beta$  cells loss of function.

### 2.5- Ceramides and hypothalamus

Several studies demonstrated that brain, and especially hypothalamus, is able to detect variations in the circulating fatty acid concentration<sup>66</sup>. FFAs are not used by hypothalamus as nutrient but as cellular messengers. Indeed, they play a major role on the control of energy balance<sup>67</sup>, including the



mammals, several ceramide species exist. In pancreatic  $\beta$  cells, it appears that in consequence of the lipotoxicity, the levels of specific ceramide species are modified, specifically Cer-C18:0, Cer-C22:0 and Cer-C24:1<sup>51</sup>. The variety of ceramide species relies on an enzyme family, the ceramide synthases (CerS)<sup>13</sup>. This family is composed by six components of which each one have been identified to possess a characteristic substrate preference for particular fatty acyl-CoA. Interestingly,  $\beta$  cell lipotoxicity is associated with an augmentation of CerS4 expression, which has been found to play a critical role in pancreatic  $\beta$  cells apoptosis (Figure 3)<sup>51</sup>. However, the specific role of each ceramide species in  $\beta$  cells dysfunction induced by lipotoxicity remains to be clarified. Indeed, a recent study showed that CerS2 knock-out mice are unable to synthesize C22-C24 ceramide species and did not result in defective insulin secretion<sup>56</sup>. More recently, it has been shown that lipotoxicity could increase ceramide levels by affecting ceramide transport<sup>57</sup>. In mammals, there are two pathways are known by which ceramides are transported from the ER to the Golgi apparatus: a protein-mediated transport, by the soluble ceramide transfer protein CERT<sup>58</sup>, and a CERT-independent vesicular traffic<sup>14 57</sup>. Lipotoxicity has been shown to impair both vesicular- and CERT-mediated ceramide transport by decreasing of phospho-PKB/Akt levels which in turn possibly inhibits vesicular traffic, and by reducing the amount of active CERT (Figure 3)<sup>57</sup>. It remains now important to determine if this defect of ceramide transport contribute to  $\beta$  cell apoptosis induced by lipotoxicity.

Ceramide have also a critical role on insulin gene expression and could cause insulin secretion defects. Ceramide generated from lipotoxicity inhibits the insulin gene expression<sup>8</sup>. The mechanism involved on the insulin expression inhibition is not related to insulin mRNA instability, but to the inhibition of glucose induced insulin promoter activity<sup>59</sup>. This inhibition is associate with a decreased binding activity of the transcription factors MafA and pancreas-duodenum homeobox 1 (PDX-1)<sup>60</sup>. MafA is affected at the level of its expression, whereas PDX-1 is affected in its ability to translocate to the nucleus<sup>60</sup>. The mechanisms though which ceramide impairs PDX-1 subcellular localization and MafA expression are unknown, even if some studies have identified potential candidates. The c-jun NH2-terminal kinase JNK is known to be a target of ceramide<sup>61</sup> and can repress insulin gene expression via c-jun—dependent inhibition of E1-mediated transcription and via c-jun independent inhibition of PDX-1 binding<sup>62</sup>. Another study demonstrate that in islet of Langerhans and  $\beta$  cell line, ceramide dependent inhibition of the insulin gene expression is mediated by the dephosphorylation of protein kinases, ERK1/2 by PP2A<sup>63</sup>. The inhibition of insulin gene expression seems also to be correlated to the inhibition of the ceramidase, which increase the intercellular levels of ceramide<sup>63</sup>. Also the ceramide transport between ER and Golgi apparatus has been demonstrate to play a role on insulin gene expression, pharmacological inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) or down-regulation by siRNA of the ceramide transporter (CERT) increase dysfunction of pancreatic  $\beta$  cells induced by palmitate by affecting the binding of transcription factors to the insulin promoter<sup>64</sup>. Ceramide seems to act also at the insulin secretion level. In Yano's study, genetic deletion of SMS1 has been shown to induce accumulation of ceramide in islet of Langerhans, dysfunction of mitochondria and the subsequent inhibition of insulin secretion<sup>65</sup>. In this study, the ceramide accumulation affected mitochondria membrane integrity and induced an excessive production of ROS, which were partially responsible for the defect in insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells<sup>65</sup>. Taken together, these results suggest that ceramide accumulation, either through the reduced conversion into more complex sphingolipids or the induction of the *de novo* synthesis, is involved in pancreatic  $\beta$  cells loss of function.

### 2.5- Ceramides and hypothalamus

Several studies demonstrated that brain, and especially hypothalamus, is able to detect variations in the circulating fatty acid concentration<sup>66</sup>. FFAs are not used by hypothalamus as nutrient but as cellular messengers. Indeed, they play a major role on the control of energy balance<sup>67</sup>, including the



regulation of the orexigenic hypothalamic neuropeptides NPY / AgRP release. However, in case of hyperlipidemia, it has recently been suggested that brain could be a new target of lipotoxicity<sup>66</sup>. Indeed, circulating fatty acids would be able to accumulate in the hypothalamus causing long-term changes in sympathetic nervous activity that would result in deregulation of glucose homeostasis. The accumulated fatty acids become toxic and especially induce a central insulin and leptin resistance that is responsible for a deregulation of the energy balance. This would block the inhibitory action of insulin on production / secretion of AgRP neuropeptides and neuropeptide Y<sup>67</sup>, contributing to obesity and also to the installation of type II diabetes. Interestingly, it has been shown that an exogenous ceramide administration on lateral ventricle hypothalamus of rats is associated with hypothalamic inflammation and ER stress<sup>68</sup>. Different studies also demonstrated that one of the pathological mechanisms of leptin resistance is mediated by hypothalamic ER stress<sup>69</sup>. These data suggest that ceramides accumulation under lipotoxic conditions in the hypothalamus could play a key role on the deregulation of the energy balance controlled by brain. However, further experiments remain to be done to establish if endogenous ceramide synthesis in the hypothalamus could be a regulator of lipotoxicity.

### 3- Ceramide metabolism and lipotoxicity: role of sphingosine-1-phosphate

Once generated, ceramides are the common precursor of several sphingolipid derivatives. They can produce a wide range of different metabolites such as sphingosine-1-phosphate (S1P), glucosylceramides, ceramide-1-phosphate and sphingomyelin, which all possess patent properties. Interestingly, like ceramides, most of these metabolites were found in human plasma at significant levels and the increase in concentration of some of them is often associated with important metabolic disturbances.

In the present review, we will focus on the role of S1P in lipotoxicity. Ceramide degradation to give S1P is initiated by ceramidases to produce sphingosine which is then phosphorylated to give S1P by sphingosine kinases (SphKs)<sup>70</sup>. Two SphK isoforms have been characterized and called SphK1 and SphK2. Both isoforms are predominantly localized in the cytosol, and in less extend in membranes. SphK1 and SphK2 display different kinetic properties, tissue distribution and temporal expression, suggesting that they perform distinct cellular functions and may be regulated differently<sup>71</sup>. SphK1 is expressed predominantly in epithelial and bronchial smooth muscle cells, whereas the expression of SphK2 is ubiquitous<sup>72</sup>. Following synthesis, S1P is exported by carriers belonging to the ABC family<sup>73</sup> and binds to its S1PR receptors (G protein-coupled) present at the cell surface. In human plasma, 65% of S1P is transported by lipoproteins (particularly HDL)<sup>74</sup>. S1P is transported to endothelial cells to bind S1PR membrane receptors and stimulate growth and survival. So far, five S1P receptors (S1P1-5) have been identified. They are expressed ubiquitously, and are coupled to different G proteins (Gi, Gq, G12/13) that regulate many signals (Rac, PI3-kinase, ERK, JNK)<sup>71</sup>. S1P, which circulates in mammals at high concentrations (> 200 nM), plays an important role in controlling both cell survival and growth (opposite effects to those of ceramides) and Sphks have emerged as important signalling enzymes. As such, SphKs control balance between ceramide and S1P and serve as "sphingolipid rheostat".

#### 3.1- In muscle and liver

In muscle, several studies demonstrated a positive action of S1P on glucose metabolism. *In vitro* studies showed that S1P stimulate glucose transport through transphosphorylation of the insulin receptor in muscle cells<sup>75</sup>. Using SphK1 activators to push the metabolism of ceramide towards S1P production, the insulin sensitivity is enhanced in muscle cells<sup>76</sup>. In addition, moderate overexpression of SphK1 in mice improves insulin sensitivity in skeletal muscle<sup>77</sup>. Similarly, injection of an adenovirus encoding for SphK1 improves glucose metabolism in obese and diabetic mice<sup>78</sup> or treating mice under high fat diet (HFD) with S1P analogue prevent appearance of insulin resistance<sup>79</sup>. However, SphK1 deficient mice fed with HFD do not seem to be more insulin resistant than wild-type



animals<sup>80</sup>. Finally, Cowart's group shows that activation of the SphK1/S1P axis is involved in the production/secretion of the pro-inflammatory IL-6 cytokine in response to palmitate in muscle<sup>81</sup>. These evidences reinforce results from an older study that also shows a deleterious effect of S1P on insulin signalling pathway in epithelial cells<sup>82</sup>. In liver, some studies have shown that S1P displays protective functions, opposite to those of ceramides<sup>83,84</sup>. Surprisingly, a very recent study shows that S1P production in response to palmitate in isolated hepatocytes induces insulin resistance<sup>85</sup>. From these data, it appears that the beneficial role of S1P in regulating insulin sensitivity during obesity is still unclear, especially in *in vivo* studies<sup>85</sup>.

### 3.2- In pancreatic $\beta$ cells

The role of S1P role in insulin secretion is still unclear. A study showed that adding S1P to culture medium of pancreatic INS-1  $\beta$  cell line and islets of Langerhans inhibits insulin secretion in response to glucose potentiated by GLP-1, mediated by S1P1 receptor coupled to Gi<sup>86</sup>. In contrast with this study, S1P was found to stimulate secretion of insulin in islets of Langerhans<sup>87</sup> and in pancreatic HIT-T 15  $\beta$  cell line<sup>88,89</sup>. Interesting, Ozcan and colleagues showed that SphK2 plays a critical role in S1P production and insulin secretion induced by glucose<sup>89</sup>. Since now, SphK1 has not been implicated in the control of insulin secretion. However, it remains to be investigated the *in vivo* role of sphingoid base phosphates by analysing insulin secretion in available SphK1 and SphK2 knock-out mice<sup>90</sup>.

The SphK1/S1P axis plays also a critical role in  $\beta$  cell survival. Indeed, adding S1P to culture medium of human or murine islets of Langerhans inhibits apoptosis induced by cytokines, mediated by the activation of the PKC pathway, through S1P2 or S1P3 receptors<sup>86,91</sup>. Pharmacological inhibition of SphK activity drastically potentiates  $\beta$  cell apoptosis whereas over-expression of SphK1 partially inhibits  $\beta$  cell induced by lipotoxicity<sup>87</sup>. The anti-apoptotic effects of sphingoid base-1-phosphate are likely to be mediated by opposing signalling pathways to ceramide-induced apoptosis (Figure 3). Indeed, SphK1 over-expression not only inhibited lipotoxicity-induced loss of mitochondrial transmembrane potential and cytochrome c release in pancreatic  $\beta$  cells<sup>80</sup>, but also impaired protein trafficking between ER and Golgi which contributed to lipotoxicity-induced ER stress in pancreatic  $\beta$  cells<sup>87</sup>. It has also been shown that another anti-apoptotic effect of sphingoid base phosphates involved the alteration of lipotoxicity-induced ceramide production in pancreatic  $\beta$  cells<sup>87</sup>. While the mechanism remains to be established, it has been proposed as hypothesis CerS inhibition mediated by S1P<sup>92</sup>. Regarding the *in vivo* protective role of SphK1 against pancreatic  $\beta$  cell apoptosis induced by lipotoxicity, Qi and colleagues showed that while a HFD-fed wild-type (WT) mice developed glucose intolerance, all the HFD-fed SphK1 knock-out mice manifested evident diabetes, due to a drastic decrease in pancreatic  $\beta$  cells mass<sup>80</sup>. However, a recent study demonstrates that under HFD SphK1 deficient mice showed enhanced insulin signalling in adipose and muscle tissues and improved systemic insulin sensitivity and glucose tolerance<sup>93</sup>. Moreover, the SphK1/S1P axis appears to stimulate the expression of cytokine by adipocytes isolated from ob/ob mice and in obese T2D patients<sup>93</sup>. Altogether, these data maintain the *in vivo* SphK1 role in lipotoxicity unclear.

### 4- Conclusions and Expert opinion

Our modern society displays a critical need: to eat quickly. Fast foods satisfy this need and their services meet the expectations of active customers. Consequently, the concept of fast food gradually replaces a traditional balanced and healthy diet. Among consequences of this mode of nutrition, two pathophysiological aspects settle in our society: obesity and T2D. Indeed, uncontrolled consumption of a food rich in saturated fatty acids (mostly palmitate) increases the risk of storage in non-adipocyte of a lipid-derivative called ceramide that is known to alter the cell function in insulin-responsive or producing tissues such as skeletal muscle, liver, adipose tissue and pancreatic  $\beta$  cells. FFA will induce a cellular lipotoxicity that leads to insulin insensitivity at the level of muscle, TA and liver, and to  $\beta$ -cells apoptosis and inhibition of insulin secretion.

Among lipid metabolites, increasing evidences indicate ceramides as the principal actor of lipotoxicity. Lipotoxicity has been demonstrated to activate the *de novo* ceramide synthesis or sphingomyelin pathway, causing ceramide accumulation, but also inhibit ceramide translocation

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/eott> Email: [Claudia.Palmer@informa.com](mailto:Claudia.Palmer@informa.com)



from the ER to Golgi apparatus (at least in pancreatic  $\beta$  cells). As presented on this review, ceramide accumulation activates many cellular pathways that induce cellular stresses and dysfunctions. Indeed, ceramide accumulation induces ER stress, ROS production and mitochondrial dysfunction that induce  $\beta$  cell apoptosis. Ceramide acts also at gene expression level, by inhibiting insulin gene expression in pancreatic  $\beta$  cells. In muscle and adipose tissue, ceramide is responsible for the installation of insulin resistance. Given the fact that the involvement of ceramide in the development of diabetes is now quite clear, the next question to revolve is whether proteins that have been demonstrated to mediate ceramide's deleterious signal in tissues could serve as potential therapeutic targets with the final aim of counteracting ceramide action. The answer is probably negative regarding aPKCs, because they are involved in the regulation of many other intracellular signaling pathways, such as the regulation of the translocation of GLUT4 containing vesicles and the activation of glucose uptake<sup>94,95</sup> but also in the regulation of the mitogenic signal transduction<sup>96</sup> and activation of nuclear factor NF-kappa B<sup>97</sup>. In hepatocytes, PKR seems to be an important kinase that mediates ceramide action. However, like with aPKCs, considering the involvement of PKR in numerous pathways, it would be difficult to target specifically PKR in order to restore insulin sensitivity. Indeed PKR is involved in immune response. Therefore, inhibiting its expression weakens the anti-viral response.

Thus, it seems that the only way to fight ceramide action would be to prevent its intracellular accumulation. Two possibilities exist to achieve this goal: (i) blocking ceramide biosynthetic pathways or (ii) pushing ceramide metabolism towards other less harmful sphingolipid derivatives.

The first possibility seems easier to achieve since many inhibitors of the *de novo* ceramide biosynthesis pathway are already commercially available. However, ceramide constitutes essential membrane components, necessary for the correct cell functioning. Ceramides are important for membrane fluidity and are ubiquitous present. Indeed, if the *de novo* ceramide synthesis pathway is blocked, as occurs with CerS (2 and 3) knock-out mice, the phenotype results to be lethal<sup>98,99</sup>. Furthermore, ceramides inhibition could be effective at short term, but the long term side effects are unknown. Currently, pharmacological inhibitors of the *de novo* ceramide synthesis exist, as myriocin. Myriocin is also an anti-inflammatory drug, and its usage could lead to an immunity imbalance and to the installation of other pathologies. Moreover, a recent study has shown the limits of this approach. Indeed, they have generated mice in which the gene encoding DES1, enzyme that transform inactive dihydroceramide into active ceramide<sup>100</sup>. Placed under high fat diet to induce insulin resistance, these mice did not produce ceramides and were much less insulin resistant than control mice in the same conditions. However, these DES1 KO mice exhibited major growth retardation, many physiological abnormalities and died 8 to 10 days after birth<sup>101</sup>. To conclude, blocking completely ceramide *de novo* biosynthesis pathway has a beneficial effect on insulin sensitivity but also kill them rapidly, the complete absence of ceramide synthesis (and of resulting sphingolipid derivatives) probably being very harmful to membrane structures and to the transduction of countless intracellular signals.

Another possibility is to focus on specific ceramide species. Accumulating works demonstrate that the toxic ceramide effect is not due to the total ceramide increase but rather to specific ceramide species, such as CerS4 in pancreatic  $\beta$  cell lipotoxicity<sup>51</sup>. Moreover, Turpin et al<sup>37</sup> have shown a strong correlation in adipose tissue between CerS6 expression, its major product, C16-ceramides, and levels of insulin resistance in human patients. At the same time, these results were supported by Raichur et al<sup>38</sup> who used mice deficient for CerS2; where they observed a dramatic compensatory increase in intracellular concentrations of C16-ceramides in the liver, predisposing the animals to steato-hepatitis and insulin resistance<sup>38</sup>. A better comprehension of which ceramide species are toxic and the development of pharmacological inhibitor of specific ceramide synthases could constitute a good strategy to inhibit lipotoxicity mediated by ceramides. Currently, CerS inhibitors do exist, but they are either toxic (like fumonisin B1), or not potent enough (like the FDA-approved FTY720). In addition, these inhibitors are not specific to a defined CerS isoform. Interestingly, Schiffmann et al. have recently developed potent selective CerS inhibitors<sup>102</sup>.

Therefore, more experiments are needed in this field to understand the precise role of CerS in lipotoxicity.

The second possibility to try to counteract the deleterious action of ceramide could be to study the regulation of their metabolic fate. Indeed, once synthesized, ceramides are then converted into other sphingolipid derivatives such as S1P. Sphingoid base phosphates and ceramides are interconvertible and have opposing effects, and it has been proposed that a dynamic balance between these two lipids could be an important factor that determines cell fate<sup>71</sup>. This concept is defined as sphingolipid biostat. The existence of this biostat offers the possibility to find new therapeutic targets in order to limit lipotoxicity observed during obesity. In pancreatic  $\beta$  cells it has been recently demonstrated that shifting the ceramide/S1P ratio using adiponectin,  $\beta$  cells functioning is preserved<sup>103</sup>. The toxic effects of ceramides could be counteracted metabolising them into less toxic lipid species as S1P or sphingomyelin. Pushing the ceramide metabolism into S1P pathway could represent a potential target to counteract the ceramide lipotoxicity induced during T2D linked to obesity. But as stated above, since most of these ceramide derivative lipids seem to play divergent role (positive or negative) considering the tissue, additional investigations on the function of S1P and its synthesizing enzymes will be necessary before to clarify their role in lipotoxicity.



## Legends to figures

**Figure 1: Sphingolipids metabolism in mammalian cells.** In mammals, there are two main pathways to produce sphingolipids. The first one is the *de novo* synthesis pathway which starts on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum (ER). The first step of this pathway results on the condensation of palmitoyl-CoA and L-serine to form 3-ketosphinganine. This reaction is mediated by serine palmitoyl-transferase (SPT). 3-Ketosphinganine is then reduced to produce dihydro-sphingosine (DH-Sph) which are transformed by ceramide synthases (CerS) on dihydro-ceramides. These one are finally desaturated into ceramides by dihydro-ceramide desaturase. Ceramides can be transported to the Golgi apparatus to be metabolized into more complex sphingolipids such as glucosyl-ceramides and sphingomyelin. The second synthesis pathway is the sphingomyelinase pathway that taking place in the lysosomal and plasma membrane. This pathway leads to the degradation of sphingomyelin (SM) into ceramides by sphingomyelinases(SM).

**Figure 2: Mechanisms mediating ceramide inhibitory action on insulin signalling.** Binding of insulin to its receptor at the plasma membrane promotes the activation of protein kinase B (PKB/Akt) via tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) and activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). The concomitant generation of phosphatidylinositol- 3,4,5-triphosphate (PIP3) (not shown) by PI3K facilitates PKB/Akt recruitment to the plasma membrane where it is activated by its upstream kinases. Activated PKB/Akt promotes glucose uptake in adipocytes and skeletal muscle, as well as glycogen synthesis in skeletal muscle and liver. In liver, insulin promotes lipogenesis and inhibits gluconeogenesis. Palmitate-generated ceramide alters insulin signalling through different mechanisms: A) In adipocytes and muscle cells, ceramide inhibits PKB/Akt through the activation of aPKCs that bind, phosphorylate and sequester PKB/Akt into caveolin-enriched microdomains; B) In liver, ceramide acts negatively on insulin signalling by inhibiting IRS through the activation of the "PKR/JNK-IKK" pathway.

**Figure 3: Role of sphingolipids in  $\beta$ -cell apoptosis during lipotoxicity.** Lipotoxicity has been shown to create an accumulation of ceramide by stimulating enzymes from *de novo* synthesis pathway such as serine palmitoyl transferase (SPT) and ceramide synthase 4 (CerS4). It can also create an accumulation of ceramides inhibiting the ceramide translocation from the endoplasmic reticulum (ER) to the golgi apparatus by blocking ceramides transporter (CerT). These ceramides can also inhibits insulin expression through inhibiting the binding of pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) and MafA transcriptional factors to insulin promoter. Moreover palmitate is also able to induced production of sphingosine 1-phosphate (S1P) and dihydro-sphingosine 1-phosphate (DH-S1P) by phosphorylation of dihydro-sphingosine (DH-Sph) by the sphingosine kinase 1 (Sphk1). Accumulation of these sphingoid base phosphates in the ER will play a protective role against palmitate-induced ceramide-dependent apoptotic  $\beta$  cell death. It was proposed that S1P and DH-S1P inhibit ceramide synthesis by acting on CerS4 activity and restore protein trafficking in the ER, alleviating ER stress and attenuating caspase-3/7 activation.



## References

1. Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med* 2006 Jan;12(1):75-80.
2. Flamment M, Hajduch E, Ferre P, Foufelle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2012 Aug;23(8):381-90.
3. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012 Mar 2;148(5):852-71.
4. Carey DG, Jenkins AB, Campbell LV, Freund J, Chisholm DJ. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes* 1996 May;45(5):633-8.
5. Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, et al. Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 1995 Nov;38(11):1295-9.
6. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963 Apr 13;1(7285):785-9.
7. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996 Jun 15;97(12):2859-65.
8. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008 May;29(3):351-66.
9. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002 Jun;32 Suppl 3:14-23.
10. Cowart LA. Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab* 2009 Jan;20(1):34-42.
11. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ, et al. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* 2010 Oct;59(10):2453-64.
12. Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J* 2012 Feb 1;441(3):789-802.
13. Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, et al. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 2003 Dec 18;426(6968):803-9.
14. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Feb;9(2):139-50.
15. Adams JM, 2nd, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 2004 Jan;53(1):25-31.
16. Coen PM, Dube JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Ferrell RE, Toledo FG, et al. Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content. *Diabetes* 2010 Jan;59(1):80-8.
17. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev* 2008 Jun;29(4):381-402.
18. Hage Hassan R, Bourron O, Hajduch E. Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World J Diabetes* 2014 Jun 15;5(3):244-57.
19. Mahfouz R, Khoury R, Blachnio-Zabielska A, Turban S, Loiseau N, Lipina C, et al. Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight. *PLoS One* 2014;9(7):e101865.
20. Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 2003 Nov 15;419(2):101-9.



21. Hajdуч E, Balendran A, Batty IH, Litherland GJ, Blair AS, Downes CP, et al. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia* 2001 Feb;44(2):173-83.
22. Nordby P, Prats C, Kristensen D, Ekroos K, Forsberg G, Andersen JL, et al. Muscle ceramide content in man is higher in type I than type II fibers and not influenced by glycogen content. *Eur J Appl Physiol* 2010 Jul;109(5):935-43.
23. Asmann YW, Stump CS, Short KR, Coenen-Schimke JM, Guo Z, Bigelow ML, et al. Skeletal muscle mitochondrial functions, mitochondrial DNA copy numbers, and gene transcript profiles in type 2 diabetic and nondiabetic subjects at equal levels of low or high insulin and euglycemia. *Diabetes* 2006 Dec;55(12):3309-19.
24. Cazzoli R, Carpenter L, Biden TJ, Schmitz-Peiffer C. A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase C $\zeta$ , in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* 2001 Oct;50(10):2210-8.
25. Turban S, Hajdуч E. Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett* 2011 Jan 21;585(2):269-74.
26. Powell DJ, Hajdуч E, Kular G, Hundal HS. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKC $\zeta$ -dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2003 Nov;23(21):7794-808.
27. Hajdуч E, Turban S, Le Liepvre X, Le Lay S, Lipina C, Dimopoulos N, et al. Targeting of PKC $\zeta$  and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem J* 2008 Mar 1;410(2):369-79.
28. Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, et al. Ceramide recruits and activates protein kinase C  $\zeta$  (PKC  $\zeta$ ) within structured membrane microdomains. *J Biol Chem* 2007 Apr 27;282(17):12450-7.
29. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997 Jun 5;387(6633):569-72.
30. Oka N, Yamamoto M, Schwencke C, Kawabe J, Ebina T, Ohno S, et al. Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem* 1997 Dec 26;272(52):33416-21.
31. Blouin CM, Prado C, Takane KK, Lasnier F, Garcia-Ocana A, Ferre P, et al. Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* 2010 Mar;59(3):600-10.
32. Yamaguchi M, Miyashita Y, Kumagai Y, Kojo S. Change in liver and plasma ceramides during D-galactosamine-induced acute hepatic injury by LC-MS/MS. *Bioorg Med Chem Lett* 2004 Aug 2;14(15):4061-4.
33. Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* 2007 Jul;6(1):69-78.
34. Holland WL, Bikman BT, Wang LP, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 2011 May;121(5):1858-70.
35. Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, Roberts AJ, Hannun YA, Samad F. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009 Jul;297(1):E211-24.
36. Kurek K, Piotrowska DM, Wiesiolek-Kurek P, Lukaszuk B, Chabowski A, Gorski J, et al. Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2013 Aug;34(7):1074-83.
37. Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM, Mourier A, Brodesser S, Wunderlich CM, et al. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab* 2014 Oct 7;20(4):678-86.
38. Raichur S, Wang ST, Chan PW, Li Y, Ching J, Chaurasia B, et al. CerS2 haploinsufficiency inhibits beta-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab* 2014 Oct 7;20(4):687-95.

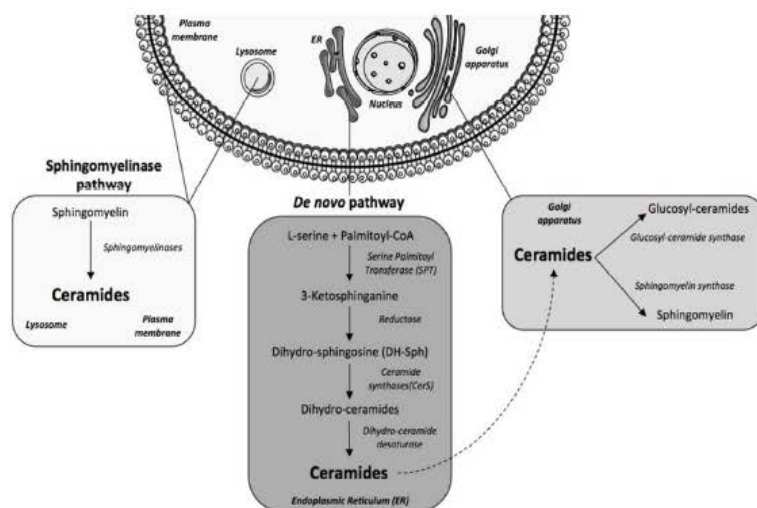


39. Merrill AH, Jr., Lingrell S, Wang E, Nikolova-Karakashian M, Vales TR, Vance DE. Sphingolipid biosynthesis de novo by rat hepatocytes in culture. Ceramide and sphingomyelin are associated with, but not required for, very low density lipoprotein secretion. *J Biol Chem* 1995 Jun 9;270(23):13834-41.
40. Boon J, Hoy AJ, Stark R, Brown RD, Meex RC, Henstridge DC, et al. Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* 2013 Feb;62(2):401-10.
41. Friedman RM, Metz DH, Esteban RM, Tovell DR, Ball LA, Kerr IM. Mechanism of interferon action: inhibition of viral messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts. *J Virol* 1972 Dec;10(6):1184-98.
42. Dabo S, Meurs EF. dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection. *Viruses* 2012 Nov;4(11):2598-635.
43. Carvalho BM, Oliveira AG, Ueno M, Araujo TG, Guadagnini D, Carvalho-Filho MA, et al. Modulation of double-stranded RNA-activated protein kinase in insulin sensitive tissues of obese humans. *Obesity (Silver Spring)* 2013 Dec;21(12):2452-7.
44. Yang X, Nath A, Opperman MJ, Chan C. The double-stranded RNA-dependent protein kinase differentially regulates insulin receptor substrates 1 and 2 in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* 2010 Oct 1;21(19):3449-58.
45. Nakamura T, Arduini A, Baccaro B, Furuhashi M, Hotamisligil GS. Small-molecule inhibitors of PKR improve glucose homeostasis in obese diabetic mice. *Diabetes* 2014 Feb;63(2):526-34.
46. Kolak M, Westerbacka J, Velagapudi VR, Wagsater D, Yetukuri L, Makkonen J, et al. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. *Diabetes* 2007 Aug;56(8):1960-8.
47. Shah C, Yang G, Lee I, Bielawski J, Hannun YA, Samad F. Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *J Biol Chem* 2008 May 16;283(20):13538-48.
48. Long SD, Pekala PH. Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 1996 Oct 1;319 ( Pt 1):179-84.
49. Barbarroja N, Rodriguez-Cuenca S, Nygren H, Camargo A, Pirraco A, Relat J, et al. Increased dihydroceramide/ceramide ratio mediated by defective expression of degs1 impairs adipocyte differentiation and function. *Diabetes* 2014 Oct 28.
50. Veluthakal R, Palanivel R, Zhao Y, McDonald P, Gruber S, Kowluru A. Ceramide induces mitochondrial abnormalities in insulin-secreting INS-1 cells: potential mechanisms underlying ceramide-mediated metabolic dysfunction of the beta cell. *Apoptosis* 2005 Aug;10(4):841-50.
51. Veret J, Coant N, Berdyshev EV, Skobeleva A, Therville N, Bailbe D, et al. Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 beta-cells. *Biochem J* 2011 Aug 15;438(1):177-89.
52. Kogot-Levin A, Saada A. Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie* 2014 May;100:88-94.
53. Lang F, Ullrich S, Gulbins E. Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function. *Expert Opin Ther Targets* 2011 Sep;15(9):1061-71.
54. Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007 Apr;50(4):752-63.
55. Boslem E, MacIntosh G, Preston AM, Bartley C, Busch AK, Fuller M, et al. A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 beta-cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem J* 2011 Apr 1;435(1):267-76.
56. Park JW, Park WJ, Kuperman Y, Boura-Halfon S, Pewzner-Jung Y, Futerman AH. Ablation of very long acyl chain sphingolipids causes hepatic insulin resistance in mice due to altered detergent-resistant membranes. *Hepatology* 2013 Feb;57(2):525-32.



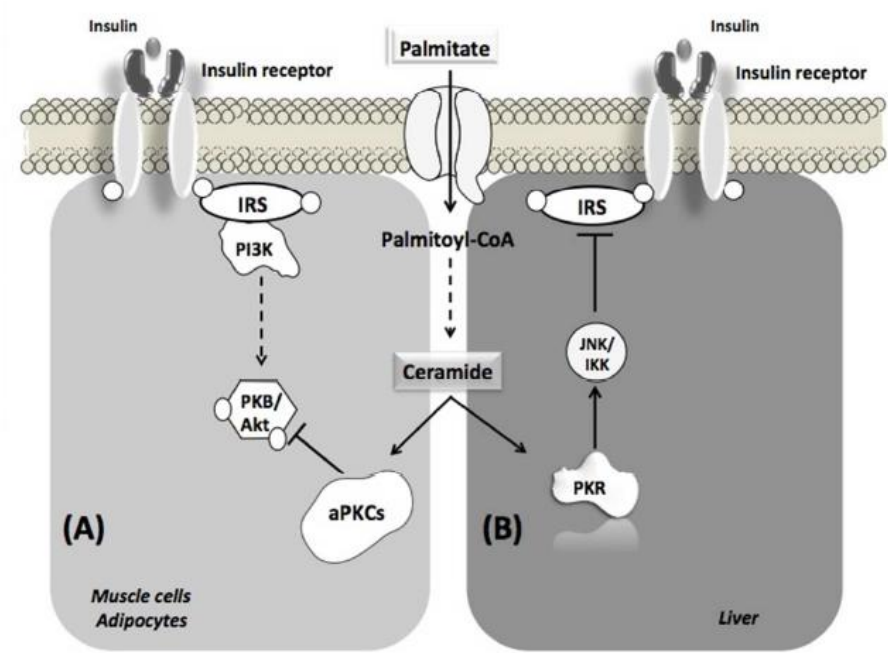
77. Bruce CR, Risis S, Babb JR, Yang C, Kowalski GM, Selathurai A, et al. Overexpression of sphingosine kinase 1 prevents ceramide accumulation and ameliorates muscle insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 2012 Dec;61(12):3148-55.
78. Ma MM, Chen JL, Wang GG, Wang H, Lu Y, Li JF, et al. Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice. *Diabetologia* 2007 Apr;50(4):891-900.
79. Kendall MR, Hupfeld CJ. FTY720, a sphingosine-1-phosphate receptor modulator, reverses high-fat diet-induced weight gain, insulin resistance and adipose tissue inflammation in C57BL/6 mice. *Diabetes Obes Metab* 2008 Sep;10(9):802-5.
80. Qi Y, Chen J, Lay A, Don A, Vadas M, Xia P. Loss of sphingosine kinase 1 predisposes to the onset of diabetes via promoting pancreatic beta-cell death in diet-induced obese mice. *Faseb J* 2013 Oct;27(10):4294-304.
81. Ross JS, Hu W, Rosen B, Snider AJ, Obeid LM, Cowart LA. Sphingosine kinase 1 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha in response to free fatty acids and is essential for skeletal muscle interleukin-6 production and signaling in diet-induced obesity. *J Biol Chem* 2013 Aug 2;288(31):22193-206.
82. Schuppel M, Kurschner U, Kleuser U, Schafer-Korting M, Kleuser B. Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype. *J Invest Dermatol* 2008 Jul;128(7):1747-56.
83. Osawa Y, Seki E, Kodama Y, Suetsugu A, Miura K, Adachi M, et al. Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. *Faseb J* 2011 Apr;25(4):1133-44.
84. Osawa Y, Uchinami H, Bielawski J, Schwabe RF, Hannun YA, Brenner DA. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 2005 Jul 29;280(30):27879-87.
85. Fayyaz S, Henkel J, Japtok L, Kramer S, Damm G, Seehofer D, et al. Involvement of sphingosine 1-phosphate in palmitate-induced insulin resistance of hepatocytes via the S1P2 receptor subtype. *Diabetologia* 2014 Feb;57(2):373-82.
86. Laychock SG, Sessanna SM, Lin MH, Mastrandrea LD. Sphingosine 1-phosphate affects cytokine-induced apoptosis in rat pancreatic islet beta-cells. *Endocrinology* 2006 Oct;147(10):4705-12.
87. Veret J, Coant N, Gorshkova IA, Giusani P, Fradet M, Riccitelli E, et al. Role of palmitate-induced sphingoid base-1-phosphate biosynthesis in INS-1 beta-cell survival. *Biochim Biophys Acta* 2013 Feb;1831(2):251-62.
88. Shimizu H, Okajima F, Kimura T, Ohtani K, Tsuchiya T, Takahashi H, et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates insulin secretion in HIT-T 15 cells and mouse islets. *Endocr J* 2000 Jun;47(3):261-9.
89. Cantrell Stanford J, Morris AJ, Sunkara M, Popa GJ, Larson KL, Ozcan S. Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2012 Apr 13;287(16):13457-64.
90. Samad F, Hester KD, Yang G, Hannun YA, Bielawski J. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* 2006 Sep;55(9):2579-87.
91. Imasawa T, Koike K, Ishii I, Chun J, Yatomi Y. Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates streptozotocin-induced apoptosis of pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Feb 5;392(2):207-11.
92. Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* 2010 May;62(5):347-56.
93. Wang J, Badeanlou L, Bielawski J, Ciaraldi TP, Samad F. Sphingosine kinase 1 regulates adipose proinflammatory responses and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014 Apr 1;306(7):E756-68.
94. Farese RV. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 Jul;283(1):E1-11.

- 1  
2  
3 95. Liu LZ, Cheung SC, Lan LL, Ho SK, Chan JC, Tong PC. The pivotal role of protein kinase C zeta  
4 (PKCzeta) in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated glucose uptake in muscle  
5 cells. *Cell Signal* 2010 Oct;22(10):1513-22.  
6 96. Berra E, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Municio MM, Sanz L, Lozano J, et al. Protein kinase C  
7 zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 1993 Aug 13;74(3):555-63.  
8 97. Diaz-Meco MT, Berra E, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Dominguez I, et al. A dominant  
9 negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 1993  
10 Aug;13(8):4770-5.  
11 98. Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, et al. Impaired epidermal  
12 permeability barrier in mice lacking elov1, the gene responsible for very-long-chain fatty acid  
13 production. *Mol Cell Biol* 2013 Jul;33(14):2787-96.  
14 99. Jennemann R, Rabionet M, Gorgas K, Epstein S, Dalpke A, Rothermel U, et al. Loss of  
15 ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet* 2011 Feb 1;21(3):586-608.  
16 100. Schulze H, Michel C, van Echten-Deckert G. Dihydroceramide desaturase. *Methods Enzymol*  
17 2000;311:22-30.  
18 101. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of  
19 ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin  
20 resistance. *Cell Metab* 2007 Mar;5(3):167-79.  
21 102. Schiffmann S, Hartmann D, Fuchs S, Birod K, Ferreiros N, Schreiber Y, et al. Inhibitors of  
22 specific ceramide synthases. *Biochimie* 2012 Feb;94(2):558-65.  
23 103. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, et al. Receptor-mediated  
24 activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 2011  
25 Jan;17(1):55-63.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

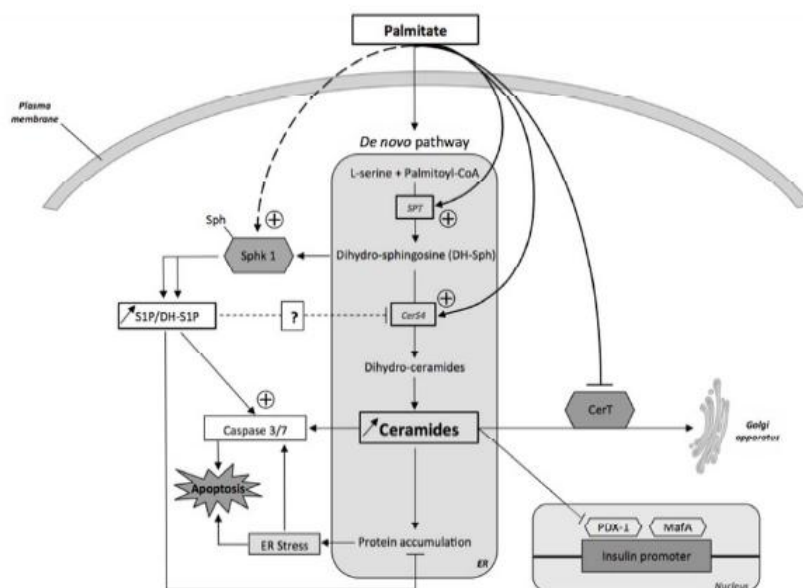


355x202mm (72 x 72 DPI)





246x183mm (72 x 72 DPI)



337x226mm (72 x 72 DPI)



## Reference List

- Aarsland,A., Chinkes,D., and Wolfe,R.R. (1997). Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am. J. Clin. Nutr.* *65*, 1774-1782.
- Aarthi,J.J., Darendeliler,M.A., and Pushparaj,P.N. (2011). Dissecting the role of the S1P/S1PR axis in health and disease. *J. Dent. Res.* *90*, 841-854.
- Abumrad,N.A., el-Maghrabi,M.R., Amri,E.Z., Lopez,E., and Grimaldi,P.A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* *268*, 17665-17668.
- Aguirre,V., Uchida,T., Yenush,L., Davis,R., and White,M.F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* *275*, 9047-9054.
- Ailhaud,G. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *24 Suppl 2*, S1-S3.
- Aiston,S., Coghlan,M.P., and Agius,L. (2003). Inactivation of phosphorylase is a major component of the mechanism by which insulin stimulates hepatic glycogen synthesis. *Eur. J. Biochem.* *270*, 2773-2781.
- Alessi,D.R., Andjelkovic,M., Caudwell,B., Cron,P., Morrice,N., Cohen,P., and Hemmings,B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* *15*, 6541-6551.
- Amati,F., Dube,J.J., Alvarez-Carnero,E., Edreira,M.M., Chomentowski,P., Coen,P.M., Switzer,G.E., Bickel,P.E., Stefanovic-Racic,M., Toledo,F.G., and Goodpaster,B.H. (2011). Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes* *60*, 2588-2597.
- Anastasiou,C.A., Kavouras,S.A., Lentzas,Y., Gova,A., Sidossis,L.S., and Melidonis,A. (2009). Diabetes mellitus is associated with increased intramyocellular triglyceride, but not diglyceride, content in obese humans. *Metabolism* *58*, 1636-1642.
- Andersen,B., Rassev,A., Westergaard,N., and Lundgren,K. (1999). Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1, 4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol. *Biochem. J.* *342 Pt 3*, 545-550.
- Anderson,E.J., Lustig,M.E., Boyle,K.E., Woodlief,T.L., Kane,D.A., Lin,C.T., Price,J.W., III, Kang,L., Rabinovitch,P.S., Szeto,H.H., Houmard,J.A., Cortright,R.N., Wasserman,D.H., and Neuffer,P.D. (2009). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J. Clin. Invest* *119*, 573-581.
- Anthonsen,M.W., Ronnstrand,L., Wernstedt,C., Degerman,E., and Holm,C. (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J. Biol. Chem.* *273*, 215-221.

- Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.E., Bruning, J.C., Haag, B., III, Johnson, R.S., and Kahn, C.R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372, 186-190.
- Aridor, M. and Balch, W.E. (2000). Kinase signaling initiates coat complex II (COPII) recruitment and export from the mammalian endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 275, 35673-35676.
- Arner, P., Einarsson, K., Ewerth, S., and Livingston, J. (1986). Studies of the human liver insulin receptor in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* 77, 1716-1718.
- Asnaghi, L., Bruno, P., Priulla, M., and Nicolin, A. (2004). mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol. Res.* 50, 545-549.
- Bajpeyi, S., Myrland, C.K., Covington, J.D., Obanda, D., Cefalu, W.T., Smith, S.R., Rustan, A.C., and Ravussin, E. (2014). Lipid in skeletal muscle myotubes is associated to the donors' insulin sensitivity and physical activity phenotypes. *Obesity. (Silver. Spring)* 22, 426-434.
- Bakirtzi, K., Belfort, G., Lopez-Coviella, I., Kuruppu, D., Cao, L., Abel, E.D., Brownell, A.L., and Kandror, K.V. (2009). Cerebellar neurons possess a vesicular compartment structurally and functionally similar to Glut4-storage vesicles from peripheral insulin-sensitive tissues. *J. Neurosci.* 29, 5193-5201.
- Balon, T.W. and Nadler, J.L. (1997). Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* (1985. ) 82, 359-363.
- Bandyopadhyay, G., Kanoh, Y., Sajan, M.P., Standaert, M.L., and Farese, R.V. (2000). Effects of adenoviral gene transfer of wild-type, constitutively active, and kinase-defective protein kinase C-lambda on insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 141, 4120-4127.
- Bandyopadhyay, G.K., Yu, J.G., Ofrecio, J., and Olefsky, J.M. (2005). Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* 54, 2351-2359.
- Baranowski, M., Charnas, M., Dlugolecka, B., and Gorski, J. (2011). Exercise increases plasma levels of sphingoid base-1 phosphates in humans. *Acta Physiol (Oxf)* 203, 373-380.
- Barbour, L.A., Mizanoor, R.S., Gurevich, I., Leitner, J.W., Fischer, S.J., Roper, M.D., Knotts, T.A., Vo, Y., McCurdy, C.E., Yakar, S., Leroith, D., Kahn, C.R., Cantley, L.C., Friedman, J.E., and Draznin, B. (2005). Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J. Biol. Chem.* 280, 37489-37494.
- Barbour, L.A., Shao, J., Qiao, L., Leitner, W., Anderson, M., Friedman, J.E., and Draznin, B. (2004). Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* 145, 1144-1150.
- Barlowe, C. (2002). COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 417-422.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895-907.
- Baron, A.D., Brechtel, G., Wallace, P., and Edelman, S.V. (1988). Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am. J. Physiol* 255, E769-E774.

- Baumann,C.A., Ribon,V., Kanzaki,M., Thurmond,D.C., Mora,S., Shigematsu,S., Bickel,P.E., Pessin,J.E., and Saltiel,A.R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 407, 202-207.
- Baumruker,T., Bornancin,F., and Billich,A. (2005). The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses. *Immunol. Lett.* 96, 175-185.
- Begum,N. and Ragolia,L. (1996). cAMP counter-regulates insulin-mediated protein phosphatase-2A inactivation in rat skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 271, 31166-31171.
- Benton,C.R., Campbell,S.E., Tonouchi,M., Hatta,H., and Bonen,A. (2004). Monocarboxylate transporters in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 249-253.
- Benton,C.R., Holloway,G.P., Campbell,S.E., Yoshida,Y., Tandon,N.N., Glatz,J.F., Luiken,J.J., Spriet,L.L., and Bonen,A. (2008). Rosiglitazone increases fatty acid oxidation and fatty acid translocase (FAT/CD36) but not carnitine palmitoyltransferase I in rat muscle mitochondria. *J. Physiol* 586, 1755-1766.
- Bernal-Mizrachi,E., Wen,W., Stahlhut,S., Welling,C.M., and Permutt,M.A. (2001). Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J. Clin. Invest* 108, 1631-1638.
- Berra,E., Diaz-Meco,M.T., Dominguez,I., Municio,M.M., Sanz,L., Lozano,J., Chapkin,R.S., and Moscat,J. (1993). Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 74, 555-563.
- Bessesen,D.H., Vensor,S.H., and Jackman,M.R. (2000). Trafficking of dietary oleic, linolenic, and stearic acids in fasted or fed lean rats. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 278, E1124-E1132.
- Bezaire,V., Bruce,C.R., Heigenhauser,G.J., Tandon,N.N., Glatz,J.F., Luiken,J.J., Bonen,A., and Spriet,L.L. (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 290, E509-E515.
- Birnbaum,M.J., Haspel,H.C., and Rosen,O.M. (1987). Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. *Science* 235, 1495-1498.
- Bishop,W.R. and Bell,R.M. (1988). Functions of diacylglycerol in glycerolipid metabolism, signal transduction and cellular transformation. *Oncogene Res.* 2, 205-218.
- Blachnio-Zabielska,A., Baranowski,M., Zabielski,P., and Gorski,J. (2008). Effect of exercise duration on the key pathways of ceramide metabolism in rat skeletal muscles. *J. Cell Biochem.* 105, 776-784.
- Blair,A.S., Hajduch,E., Litherland,G.J., and Hundal,H.S. (1999). Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 36293-36299.
- Blouin,C., Prado,C., Takane,K.K., Lasnier,F., Garcia-Ocana,A., Ferre,P., Dugail,I., and Hajduch,E. (2010a). Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* 59, 600-610.

- Blouin,C.M., Prado,C., Takane,K.K., Lasnier,F., Garcia-Ocana,A., Ferre,P., Dugail,I., and Hajduch,E. (2010b). Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* 59, 600-610.
- Bogan,J.S. (2012). Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 507-532.
- Bollen,M., Keppens,S., and Stalmans,W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336 ( Pt 1), 19-31.
- Bollheimer,L.C., Landauer,H.C., Troll,S., Schweimer,J., Wrede,C.E., Scholmerich,J., and Buettner,R. (2004). Stimulatory short-term effects of free fatty acids on glucagon secretion at low to normal glucose concentrations. *Metabolism* 53, 1443-1448.
- Bonnard,C., Durand,A., Peyrol,S., Chanseaux,E., Chauvin,M.A., Morio,B., Vidal,H., and Rieusset,J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest* 118, 789-800.
- Boura-Halfon,S. and Zick,Y. (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 296, E581-E591.
- Bourbon,N.A., Yun,J., and Kester,M. (2000). Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J. Biol. Chem.* 275, 35617-35623.
- Bouzakri,K., Roques,M., Gual,P., Espinosa,S., Guebre-Egziabher,F., Riou,J.P., Laville,M., Le Marchand-Brustel,Y., Tanti,J.F., and Vidal,H. (2003). Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 1319-1325.
- Brissova,M., Blaha,M., Spear,C., Nicholson,W., Radhika,A., Shiota,M., Charron,M.J., Wright,C.V., and Powers,A.C. (2005). Reduced PDX-1 expression impairs islet response to insulin resistance and worsens glucose homeostasis. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 288, E707-E714.
- Brissova,M., Shiota,M., Nicholson,W.E., Gannon,M., Knobel,S.M., Piston,D.W., Wright,C.V., and Powers,A.C. (2002). Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 277, 11225-11232.
- Brognaard,J. and Newton,A.C. (2008). PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol. Metab* 19, 223-230.
- Brose,N., Betz,A., and Wegmeyer,H. (2004). Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 328-340.
- Bruce,C.R., Risis,S., Babb,J.R., Yang,C., Kowalski,G.M., Selathurai,A., Lee-Young,R.S., Weir,J.M., Yoshioka,K., Takuwa,Y., Meikle,P.J., Pitson,S.M., and Febbraio,M.A. (2012). Overexpression of sphingosine kinase 1 prevents ceramide accumulation and ameliorates muscle insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 61, 3148-3155.
- Bruce,C.R., Risis,S., Babb,J.R., Yang,C., Lee-Young,R.S., Henstridge,D.C., and Febbraio,M.A. (2013). The sphingosine-1-phosphate analog FTY720 reduces muscle ceramide content and improves glucose tolerance in high fat-fed male mice. *Endocrinology* 154, 65-76.

- Bruce, C.R., Thrush, A.B., Mertz, V.A., Bezaire, V., Chabowski, A., Heigenhauser, G.J., and Dyck, D.J. (2006). Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 291, E99-E107.
- Bruss, M.D., Arias, E.B., Lienhard, G.E., and Cartee, G.D. (2005). Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes* 54, 41-50.
- Bryant, N.J. and Gould, G.W. (2011). SNARE proteins underpin insulin-regulated GLUT4 traffic. *Traffic* 12, 657-664.
- Bryant, N.J., Govers, R., and James, D.E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 267-277.
- Burcelin, R., Knauf, C., and Cani, P.D. (2008). Pancreatic alpha-cell dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2, S49-S55.
- Campbell, S.E., Tandon, N.N., Woldegiorgis, G., Luiken, J.J., Glatz, J.F., and Bonen, A. (2004). A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 36235-36241.
- Cantley, J., Burchfield, J.G., Pearson, G.L., Schmitz-Peiffer, C., Leitges, M., and Biden, T.J. (2009). Deletion of PKCepsilon selectively enhances the amplifying pathways of glucose-stimulated insulin secretion via increased lipolysis in mouse beta-cells. *Diabetes* 58, 1826-1834.
- Cantley, L.C. and Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 4240-4245.
- Carlsson, A. and Hillarp, N.A. (1958). On the state of the catechol amines of the adrenal medullary granules. *Acta Physiol Scand.* 44, 163-169.
- Caro, J.F., Sinha, M.K., Raju, S.M., Ittoop, O., Pories, W.J., Flickinger, E.G., Meelheim, D., and Dohm, G.L. (1987). Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J. Clin. Invest* 79, 1330-1337.
- Carrasco, S. and Meyer, T. (2011). STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 973-1000.
- Cartee, G.D. (2015). Roles of TBC1D1 and TBC1D4 in insulin- and exercise-stimulated glucose transport of skeletal muscle. *Diabetologia* 58, 19-30.
- Caserta, T.M., Smith, A.N., Gultice, A.D., Reedy, M.A., and Brown, T.L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 8, 345-352.
- Cazzolli, R., Carpenter, L., Biden, T.J., and Schmitz-Peiffer, C. (2001). A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase C $\zeta$ , in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* 50, 2210-2218.
- Chalfant, C.E. and Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* 118, 4605-4612.

- Chandran,S. and Machamer,C.E. (2012a). Inactivation of ceramide transfer protein during pro-apoptotic stress by Golgi disassembly and caspase cleavage. *Biochem. J.* 442, 391-401.
- Chandran,S. and Machamer,C.E. (2012b). Inactivation of ceramide transfer protein during pro-apoptotic stress by Golgi disassembly and caspase cleavage. *Biochem. J.* 442, 391-401.
- Chatelut,M., Leruth,M., Harzer,K., Dagan,A., Marchesini,S., Gatt,S., Salvayre,R., Courtoy,P., and Levade,T. (1998). Natural ceramide is unable to escape the lysosome, in contrast to a fluorescent analogue. *FEBS Lett.* 426, 102-106.
- Chavez,J.A. and Summers,S.A. (2003). Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 101-109.
- Chawla,A., Nguyen,K.D., and Goh,Y.P. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 738-749.
- Chen,X., Shen,J., and Prywes,R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J. Biol. Chem.* 277, 13045-13052.
- Cherrington,A.D., Edgerton,D., and Sindelar,D.K. (1998). The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia* 41, 987-996.
- Chiang,S.H., Baumann,C.A., Kanzaki,M., Thurmond,D.C., Watson,R.T., Neudauer,C.L., Macara,I.G., Pessin,J.E., and Saltiel,A.R. (2001). Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410, 944-948.
- Chiu,T.T., Jensen,T.E., Sylow,L., Richter,E.A., and Klip,A. (2011). Rac1 signalling towards GLUT4/glucose uptake in skeletal muscle. *Cell Signal.* 23, 1546-1554.
- Chiu,T.T., Patel,N., Shaw,A.E., Bamburg,J.R., and Klip,A. (2010). Arp2/3- and cofilin-coordinated actin dynamics is required for insulin-mediated GLUT4 translocation to the surface of muscle cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 3529-3539.
- Chiu,T.T., Sun,Y., Koshkina,A., and Klip,A. (2013). Rac-1 superactivation triggers insulin-independent glucose transporter 4 (GLUT4) translocation that bypasses signaling defects exerted by c-Jun N-terminal kinase (JNK)- and ceramide-induced insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 288, 17520-17531.
- Cho,H., Thorvaldsen,J.L., Chu,Q., Feng,F., and Birnbaum,M.J. (2001). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 276, 38349-38352.
- Cho,U.S., Morrone,S., Sablina,A.A., Arroyo,J.D., Hahn,W.C., and Xu,W. (2007). Structural basis of PP2A inhibition by small t antigen. *PLoS. Biol.* 5, e202.
- Chun,J., Hyun,S., Kwon,T., Lee,E.J., Hong,S.K., and Kang,S.S. (2005). The subcellular localization control of integrin linked kinase 1 through its protein-protein interaction with caveolin-1. *Cell Signal.* 17, 751-760.
- Clarke,C.J. and Hannun,Y.A. (2006). Neutral sphingomyelinases and nSMase2: bridging the gaps. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1893-1901.

- Clarke,C.J., Snook,C.F., Tani,M., Matmati,N., Marchesini,N., and Hannun,Y.A. (2006). The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* 45, 11247-11256.
- Clarke,J.F., Young,P.W., Yonezawa,K., Kasuga,M., and Holman,G.D. (1994). Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem. J.* 300 ( Pt 3), 631-635.
- Coen,P.M., Hames,K.C., Leachman,E.M., DeLany,J.P., Ritov,V.B., Menshikova,E.V., Dube,J.J., Stefanovic-Racic,M., Toledo,F.G., and Goodpaster,B.H. (2013). Reduced skeletal muscle oxidative capacity and elevated ceramide but not diacylglycerol content in severe obesity. *Obesity. (Silver. Spring)* 21, 2362-2371.
- Cohen,A.W., Razani,B., Wang,X.B., Combs,T.P., Williams,T.M., Scherer,P.E., and Lisanti,M.P. (2003). Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 285, C222-C235.
- Coleman,R.A. and Mashek,D.G. (2011). Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem. Rev.* 111, 6359-6386.
- Coll,T., Eyre,E., Rodriguez-Calvo,R., Palomer,X., Sanchez,R.M., Merlos,M., Laguna,J.C., and Vazquez-Carrera,M. (2008). Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 283, 11107-11116.
- Coll,T., Jove,M., Rodriguez-Calvo,R., Eyre,E., Palomer,X., Sanchez,R.M., Merlos,M., Laguna,J.C., and Vazquez-Carrera,M. (2006). Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* 55, 2779-2787.
- Copps,K.D. and White,M.F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55, 2565-2582.
- Cortright,R.N., Azevedo,J.L., Jr., Zhou,Q., Sinha,M., Pories,W.J., Itani,S.I., and Dohm,G.L. (2000). Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 278, E553-E562.
- Cross,D.A., Alessi,D.R., Cohen,P., Andjelkovich,M., and Hemmings,B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Csak,T., Dolganiuc,A., Kodys,K., Nath,B., Petrasek,J., Bala,S., Lippai,D., and Szabo,G. (2011). Mitochondrial antiviral signaling protein defect links impaired antiviral response and liver injury in steatohepatitis in mice. *Hepatology* 53, 1917-1931.
- Cusi,K., Maezono,K., Osman,A., Pendergrass,M., Patti,M.E., Pratipanawatr,T., DeFronzo,R.A., Kahn,C.R., and Mandarino,L.J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest* 105, 311-320.
- Damen,J.E., Liu,L., Rosten,P., Humphries,R.K., Jefferson,A.B., Majerus,P.W., and Krystal,G. (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1689-1693.

de Lange P., Lombardi,A., Silvestri,E., Goglia,F., Lanni,A., and Moreno,M. (2008). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta: A Conserved Director of Lipid Homeostasis through Regulation of the Oxidative Capacity of Muscle. *PPAR. Res.* 2008, 172676.

DeFronzo,R.A. (1988). Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37, 667-687.

DeFronzo,R.A., Gunnarsson,R., Bjorkman,O., Olsson,M., and Wahren,J. (1985). Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* 76, 149-155.

DeFronzo,R.A., Jacot,E., Jequier,E., Maeder,E., Wahren,J., and Felber,J.P. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30, 1000-1007.

Dennis,P.B., Fumagalli,S., and Thomas,G. (1999). Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 49-54.

Dequiedt,F., Van,L.J., Lecomte,E., Van,D., V, Seufferlein,T., Vandenheede,J.R., Wattiez,R., and Kettmann,R. (2005). Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J. Exp. Med.* 201, 793-804.

Desai,K., Sullards,M.C., Allegood,J., Wang,E., Schmelz,E.M., Hartl,M., Humpf,H.U., Liotta,D.C., Peng,Q., and Merrill,A.H., Jr. (2002). Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 188-192.

Devillard,R., Galvani,S., Thiers,J.C., Guenet,J.L., Hannun,Y., Bielawski,J., Negre-Salvayre,A., Salvayre,R., and Audebert,N. (2010). Stress-induced sphingolipid signaling: role of type-2 neutral sphingomyelinase in murine cell apoptosis and proliferation. *PLoS. One.* 5, e9826.

Devries,M.C., Samjoo,I.A., Hamadeh,M.J., McCready,C., Raha,S., Watt,M.J., Steinberg,G.R., and Tarnopolsky,M.A. (2013). Endurance training modulates intramyocellular lipid compartmentalization and morphology in skeletal muscle of lean and obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 98, 4852-4862.

Di,C.A. and Pandolfi,P.P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100, 387-390.

Diaz-Meco,M.T., Berra,E., Municio,M.M., Sanz,L., Lozano,J., Dominguez,I., Diaz-Golpe,V., Lain de Lera,M.T., Alcami,J., Paya,C.V., and . (1993). A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol. Cell Biol.* 13, 4770-4775.

Dickens,M., Svitek,C.A., Culbert,A.A., O'Brien,R.M., and Tavaré,J.M. (1998). Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* 273, 20144-20149.

Digel,M., Staffer,S., Eehalt,F., Stremmel,W., Eehalt,R., and Fullekrug,J. (2011). FATP4 contributes as an enzyme to the basal and insulin-mediated fatty acid uptake of C(2)C(1)(2) muscle cells. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 301, E785-E796.

Dimopoulos,N., Watson,M., Sakamoto,K., and Hundal,H.S. (2006). Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem. J.* 399, 473-481.



- Dobbins,R.L., Szczepaniak,L.S., Myhill,J., Tamura,Y., Uchino,H., Giacca,A., and McGarry,J.D. (2002). The composition of dietary fat directly influences glucose-stimulated insulin secretion in rats. *Diabetes* 51, 1825-1833.
- Dobrzyn,A. and Gorski,J. (2002). Effect of acute exercise on the content of free sphinganine and sphingosine in different skeletal muscle types of the rat. *Horm. Metab Res.* 34, 523-529.
- Doherty,G.J. and McMahon,H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857-902.
- Dohm,G.L., Dolan,P.L., Frisell,W.R., and Dudek,R.W. (1993). Role of transverse tubules in insulin stimulated muscle glucose transport. *J. Cell Biochem.* 52, 1-7.
- Donath,M.Y. (2011). Inflammation as a sensor of metabolic stress in obesity and type 2 diabetes. *Endocrinology* 152, 4005-4006.
- Donath,M.Y. (2013). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab* 15 *Suppl* 3, 193-196.
- Douen,A.G., Ramlal,T., Cartee,G.D., and Klip,A. (1990a). Exercise modulates the insulin-induced translocation of glucose transporters in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 261, 256-260.
- Douen,A.G., Ramlal,T., Klip,A., Young,D.A., Cartee,G.D., and Holloszy,J.O. (1989). Exercise-induced increase in glucose transporters in plasma membranes of rat skeletal muscle. *Endocrinology* 124, 449-454.
- Douen,A.G., Ramlal,T., Rastogi,S., Bilan,P.J., Cartee,G.D., Vranic,M., Holloszy,J.O., and Klip,A. (1990b). Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 265, 13427-13430.
- Draznin,B. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* 55, 2392-2397.
- Dresner,A., Laurent,D., Marcucci,M., Griffin,M.E., Dufour,S., Cline,G.W., Slezak,L.A., Andersen,D.K., Hundal,R.S., Rothman,D.L., Petersen,K.F., and Shulman,G.I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest* 103, 253-259.
- Dube,J.J., Amati,F., Stefanovic-Racic,M., Toledo,F.G., Sauers,S.E., and Goodpaster,B.H. (2008). Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 294, E882-E888.
- Dufour,S., Lebon,V., Shulman,G.I., and Petersen,K.F. (2009). Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis by epinephrine in humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 297, E231-E235.
- Dummler,B. and Hemmings,B.A. (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 231-235.
- Duris,A., Wiesenganger,T., Moravcikova,D., Baran,P., Kozisek,J., Daich,A., and Berkes,D. (2011). Expedient and practical synthesis of CERT-dependent ceramide trafficking inhibitor HPA-12 and its analogues. *Org. Lett.* 13, 1642-1645.

Duval,C., Camara,Y., Hondares,E., Sibille,B., and Villarroya,F. (2007). Overexpression of mitochondrial uncoupling protein-3 does not decrease production of the reactive oxygen species, elevated by palmitate in skeletal muscle cells. *FEBS Lett.* 581, 955-961.

Dyck,D.J. and Bonen,A. (1998). Muscle contraction increases palmitate esterification and oxidation and triacylglycerol oxidation. *Am. J. Physiol* 275, E888-E896.

Dyck,D.J., Peters,S.J., Glatz,J., Gorski,J., Keizer,H., Kiens,B., Liu,S., Richter,E.A., Spriet,L.L., Van der Vusse,G.J., and Bonen,A. (1997). Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of various fiber types. *Am. J. Physiol* 272, E340-E351.

Dyck,D.J., Steinberg,G., and Bonen,A. (2001). Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 281, E600-E607.

Easton,R.M., Cho,H., Roovers,K., Shineman,D.W., Mizrahi,M., Forman,M.S., Lee,V.M., Szabolcs,M., de,J.R., Oltersdorf,T., Ludwig,T., Efstratiadis,A., and Birnbaum,M.J. (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol. Cell Biol.* 25, 1869-1878.

Fantin,V.R., Wang,Q., Lienhard,G.E., and Keller,S.R. (2000). Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 278, E127-E133.

Farese,R.V. (2001). Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. *Exp. Biol. Med.* (Maywood. ) 226, 283-295.

Farese,R.V. (2002). Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 283, E1-11.

Farese,R.V., Sajan,M.P., Yang,H., Li,P., Mastorides,S., Gower,W.R., Jr., Nimal,S., Choi,C.S., Kim,S., Shulman,G.I., Kahn,C.R., Braun,U., and Leitges,M. (2007). Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *J. Clin. Invest* 117, 2289-2301.

Farese,R.V., Jr. and Walther,T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855-860.

Fayyaz,S., Japtok,L., and Kleuser,B. (2014). Divergent role of sphingosine 1-phosphate on insulin resistance. *Cell Physiol Biochem.* 34, 134-147.

Fitscher,B.A., Riedel,H.D., Young,K.C., and Stremmel,W. (1998). Tissue distribution and cDNA cloning of a human fatty acid transport protein (hsFATP4). *Biochim. Biophys. Acta* 1443, 381-385.

Floegel,A., Stefan,N., Yu,Z., Muhlenbruch,K., Drogan,D., Joost,H.G., Fritsche,A., Haring,H.U., Hrabe de,A.M., Peters,A., Roden,M., Prehn,C., Wang-Sattler,R., Illig,T., Schulze,M.B., Adamski,J., Boeing,H., and Pischon,T. (2013). Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 62, 639-648.

Foti,M., Porcheron,G., Fournier,M., Maeder,C., and Carpentier,J.L. (2007). The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 1242-1247.

- Fox, T.E., Houck, K.L., O'Neill, S.M., Nagarajan, M., Stover, T.C., Pomianowski, P.T., Unal, O., Yun, J.K., Naides, S.J., and Kester, M. (2007). Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J. Biol. Chem.* **282**, 12450-12457.
- Franz-Wachtel, M., Eisler, S.A., Krug, K., Wahl, S., Carpy, A., Nordheim, A., Pfizenmaier, K., Hausser, A., and Macek, B. (2012). Global detection of protein kinase D-dependent phosphorylation events in nocodazole-treated human cells. *Mol. Cell Proteomics*. **11**, 160-170.
- Freidenberg, G.R., Reichart, D., Olefsky, J.M., and Henry, R.R. (1988). Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J. Clin. Invest* **82**, 1398-1406.
- Frevert, E.U. and Kahn, B.B. (1997). Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol.* **17**, 190-198.
- Fruman, D.A. (2010). Regulatory subunits of class IA PI3K. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **346**, 225-244.
- Fruman, D.A., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L. (1996). Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* **37**, 113-121.
- Fugmann, T., Hausser, A., Schoffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., and Olayioye, M.A. (2007a). Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J. Cell Biol.* **178**, 15-22.
- Fugmann, T., Hausser, A., Schoffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., and Olayioye, M.A. (2007b). Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J. Cell Biol.* **178**, 15-22.
- Fukasawa, M., Nishijima, M., and Hanada, K. (1999). Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* **144**, 673-685.
- Furuchi, T. and Anderson, R.G. (1998). Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J. Biol. Chem.* **273**, 21099-21104.
- Futerman, A.H. (2006). Intracellular trafficking of sphingolipids: relationship to biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1885-1892.
- Futerman, A.H. and Pagano, R.E. (1991). Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem. J.* **280** ( Pt 2), 295-302.
- Futerman, A.H. and Riezman, H. (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* **15**, 312-318.
- Gangoiti, P., Bernacchioni, C., Donati, C., Cencetti, F., Ouro, A., Gomez-Munoz, A., and Bruni, P. (2012). Ceramide 1-phosphate stimulates proliferation of C2C12 myoblasts. *Biochimie* **94**, 597-607.
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell* **18**, 13-24.

Gao,Z., Zhang,X., Zuberi,A., Hwang,D., Quon,M.J., Lefevre,M., and Ye,J. (2004). Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2024-2034.

Garcia-Calvo,M., Peterson,E.P., Leiting,B., Ruel,R., Nicholson,D.W., and Thornberry,N.A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* **273**, 32608-32613.

Garvey,W.T., Maianu,L., Zhu,J.H., Brechtel-Hook,G., Wallace,P., and Baron,A.D. (1998). Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J. Clin. Invest* **101**, 2377-2386.

Ghauharali-van der Vlugt,K., Langeveld,M., Poppema,A., Kuiper,S., Hollak,C.E., Aerts,J.M., and Groener,J.E. (2008). Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease. *Clin. Chim. Acta* **389**, 109-113.

Gillard,B.K., Clement,R.G., and Marcus,D.M. (1998). Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* **8**, 885-890.

Gimeno,R.E. (2007). Fatty acid transport proteins. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 271-276.

Gingras,A.C., Raught,B., and Sonenberg,N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* **15**, 807-826.

Girard,J. (2006). Insulin's effect on the liver: "direct or indirect?" continues to be the question. *J. Clin. Invest* **116**, 302-304.

Girard,J., Ferre,P., and Foufelle,F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 325-352.

Giussani,P., Colleoni,T., Brioschi,L., Bassi,R., Hanada,K., Tettamanti,G., Riboni,L., and Viani,P. (2008). Ceramide traffic in C6 glioma cells: evidence for CERT-dependent and independent transport from ER to the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 40-51.

Glatz,J.F., Luiken,J.J., and Bonen,A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev.* **90**, 367-417.

Glynn,E.L., Lujan,H.L., Kramer,V.J., Drummond,M.J., DiCarlo,S.E., and Rasmussen,B.B. (2008). A chronic increase in physical activity inhibits fed-state mTOR/S6K1 signaling and reduces IRS-1 serine phosphorylation in rat skeletal muscle. *Appl. Physiol Nutr. Metab* **33**, 93-101.

Godi,A., Di,C.A., Konstantakopoulos,A., Di,T.G., Alessi,D.R., Kular,G.S., Daniele,T., Marra,P., Lucocq,J.M., and De Matteis,M.A. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat. Cell Biol.* **6**, 393-404.

Gomez-Munoz,A. (1998). Modulation of cell signalling by ceramides. *Biochim. Biophys. Acta* **1391**, 92-109.

Gomez-Munoz,A. (2004). Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett.* **562**, 5-10.

- Goodpaster,B.H., He,J., Watkins,S., and Kelley,D.E. (2001). Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 5755-5761.
- Goodyear,L.J., Giorgino,F., Sherman,L.A., Carey,J., Smith,R.J., and Dohm,G.L. (1995). Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J. Clin. Invest* 95, 2195-2204.
- Goodyear,L.J., Hirshman,M.F., Smith,R.J., and Horton,E.S. (1991). Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. *Am. J. Physiol* 261, E556-E561.
- Gorski,J. and Bonen,A. (1997). Palmitate incorporation into lipids pools of contracting red and white muscles. *Mol. Cell Biochem.* 166, 73-83.
- Gotz,J., Probst,A., Ehler,E., Hemmings,B., and Kues,W. (1998). Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 12370-12375.
- Gregor,M.F., Yang,L., Fabbrini,E., Mohammed,B.S., Eagon,J.C., Hotamisligil,G.S., and Klein,S. (2009). Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58, 693-700.
- Grempler,R., Zibrova,D., Schoelch,C., van,M.A., Rippmann,J.F., and Redemann,N. (2007). Normalization of prandial blood glucose and improvement of glucose tolerance by liver-specific inhibition of SH2 domain containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) in diabetic KKAY mice: SHIP2 inhibition causes insulin-mimetic effects on glycogen metabolism, gluconeogenesis, and glycolysis. *Diabetes* 56, 2235-2241.
- Gromada,J., Franklin,I., and Wollheim,C.B. (2007). Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr. Rev.* 28, 84-116.
- Grosshans,B.L., Ortiz,D., and Novick,P. (2006). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 11821-11827.
- Gu,L., Huang,B., Shen,W., Gao,L., Ding,Z., Wu,H., and Guo,J. (2013). Early activation of nSMase2/ceramide pathway in astrocytes is involved in ischemia-associated neuronal damage via inflammation in rat hippocampi. *J. Neuroinflammation.* 10, 109.
- Gual,P., Le Marchand-Brustel,Y., and Tanti,J.F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99-109.
- Guerre-Millo,M. (2004). Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 30, 13-19.
- Gupte,A.A., Bomhoff,G.L., Morris,J.K., Gorres,B.K., and Geiger,P.C. (2009). Lipoic acid increases heat shock protein expression and inhibits stress kinase activation to improve insulin signaling in skeletal muscle from high-fat-fed rats. *J. Appl. Physiol* (1985. ) 106, 1425-1434.
- Gustavsson,J., Parpal,S., Karlsson,M., Ramsing,C., Thorn,H., Borg,M., Lindroth,M., Peterson,K.H., Magnusson,K.E., and Stralfors,P. (1999). Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J.* 13, 1961-1971.

- Habegger,K.M., Hoffman,N.J., Ridenour,C.M., Brozinick,J.T., and Elmendorf,J.S. (2012). AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol. *Endocrinology* 153, 2130-2141.
- Hage Hassan, Bourron,O., and Hajduch,E. (2014). Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World J. Diabetes* 5, 244-257.
- Hage Hassan, Hainault,I., Vilquin,J.T., Samama,C., Lasnier,F., Ferre,P., Foufelle,F., and Hajduch,E. (2012). Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55, 204-214.
- Hage Hassan., Hainault,I., Vilquin,J.T., Samama,C., Lasnier,F., Ferre,P., Foufelle,F., and Hajduch,E. (2012). Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55, 204-214.
- Hajduch,E., Alessi,D.R., Hemmings,B.A., and Hundal,H.S. (1998). Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47, 1006-1013.
- Hajduch,E., Balendran,A., Batty,I.H., Litherland,G.J., Blair,A.S., Downes,C.P., and Hundal,H.S. (2001). Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia* 44, 173-183.
- Hajduch,E., Turban,S., Le,L., X, Le,L.S., Lipina,C., Dimopoulos,N., Dugail,I., and Hundal,H.S. (2008a). Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem. J.* 410, 369-379.
- Hajduch,E., Turban,S., Le,L., X, Le,L.S., Lipina,C., Dimopoulos,N., Dugail,I., and Hundal,H.S. (2008b). Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem. J.* 410, 369-379.
- Hakomori,S. (1981). Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 733-764.
- Halse,R., Bonavaud,S.M., Armstrong,J.L., McCormack,J.G., and Yeaman,S.J. (2001). Control of glycogen synthesis by glucose, glycogen, and insulin in cultured human muscle cells. *Diabetes* 50, 720-726.
- Hammad,S.M., Al Gadban,M.M., Semler,A.J., and Klein,R.L. (2012). Sphingosine 1-phosphate distribution in human plasma: associations with lipid profiles. *J. Lipids* 2012, 180705.
- Hammad,S.M., Pierce,J.S., Soodavar,F., Smith,K.J., Al Gadban,M.M., Rembiesa,B., Klein,R.L., Hannun,Y.A., Bielawski,J., and Bielawska,A. (2010). Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J. Lipid Res.* 51, 3074-3087.
- Hanada,K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1632, 16-30.
- Hanada,K. (2014). Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 704-719.
- Hanada,K., Kumagai,K., Tomishige,N., and Kawano,M. (2007a). CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 644-653.

- Hanada,K., Kumagai,K., Tomishige,N., and Kawano,M. (2007b). CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 644-653.
- Hanada,K., Kumagai,K., Tomishige,N., and Yamaji,T. (2009). CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 684-691.
- Hanada,K., Kumagai,K., Yasuda,S., Miura,Y., Kawano,M., Fukasawa,M., and Nishijima,M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803-809.
- Hannun,Y.A. (1994). The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* 269, 3125-3128.
- Hannun,Y.A. and Luberto,C. (2004). Lipid metabolism: ceramide transfer protein adds a new dimension. *Curr. Biol.* 14, R163-R165.
- Hannun,Y.A. and Obeid,L.M. (2011). Many ceramides. *J. Biol. Chem.* 286, 27855-27862.
- Hara,H., Friedlander,R.M., Gagliardini,V., Ayata,C., Fink,K., Huang,Z., Shimizu-Sasamata,M., Yuan,J., and Moskowitz,M.A. (1997). Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2007-2012.
- Hara,K., Yonezawa,K., Sakaue,H., Ando,A., Kotani,K., Kitamura,T., Kitamura,Y., Ueda,H., Stephens,L., Jackson,T.R., and . (1994). 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 7415-7419.
- Hardie,D.G. (2004). AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36, 28-34.
- Harding,H.P., Zhang,Y., and Ron,D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.
- Hardwick,J.S., Kuruvilla,F.G., Tong,J.K., Shamji,A.F., and Schreiber,S.L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14866-14870.
- Harrington,L.S., Findlay,G.M., Gray,A., Tolkacheva,T., Wigfield,S., Rebholz,H., Barnett,J., Leslie,N.R., Cheng,S., Shepherd,P.R., Gout,I., Downes,C.P., and Lamb,R.F. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166, 213-223.
- Hartmann,D., Lucks,J., Fuchs,S., Schiffmann,S., Schreiber,Y., Ferreiros,N., Merckens,J., Marschalek,R., Geisslinger,G., and Grosch,S. (2012). Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 620-628.
- Hashiramoto,M. and James,D.E. (2000). Characterization of insulin-responsive GLUT4 storage vesicles isolated from 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol.* 20, 416-427.
- Hausser,A., Storz,P., Martens,S., Link,G., Toker,A., and Pfizenmaier,K. (2005). Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 7, 880-886.
- Havens,L., Danielsson,K.N., Fogelstrand,L., and Wiklund,O. (2009). Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis* 202, 382-393.

Haynes,R.C., Jr. and Picking,R.A. (1990). The role of inhibition of pyruvate kinase in the stimulation of gluconeogenesis by glucagon: a reevaluation. *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 51-59.

Helge,J.W., Dobrzyn,A., Saltin,B., and Gorski,J. (2004). Exercise and training effects on ceramide metabolism in human skeletal muscle. *Exp. Physiol* 89, 119-127.

Hetz,C., Martinon,F., Rodriguez,D., and Glimcher,L.H. (2011). The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiol Rev.* 91, 1219-1243.

Hiltunen,J.K., Karki,T., Hassinen,I.E., and Osmundsen,H. (1986). beta-Oxidation of polyunsaturated fatty acids by rat liver peroxisomes. A role for 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase in peroxisomal beta-oxidation. *J. Biol. Chem.* 261, 16484-16493.

Hinkovska-Galcheva,V., Boxer,L.A., Kindzelskii,A., Hiraoka,M., Abe,A., Goparju,S., Spiegel,S., Petty,H.R., and Shayman,J.A. (2005). Ceramide 1-phosphate, a mediator of phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 280, 26612-26621.

Hinkovska-Galcheva,V.T., Boxer,L.A., Mansfield,P.J., Harsh,D., Blackwood,A., and Shayman,J.A. (1998). The formation of ceramide-1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion. *J. Biol. Chem.* 273, 33203-33209.

Hirosumi,J., Tuncman,G., Chang,L., Gorgun,C.Z., Uysal,K.T., Maeda,K., Karin,M., and Hotamisligil,G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.

Hirshman,M.F., Wallberg-Henriksson,H., Wardzala,L.J., Horton,E.D., and Horton,E.S. (1988). Acute exercise increases the number of plasma membrane glucose transporters in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 238, 235-239.

Hoehn,K.L., Salmon,A.B., Hohnen-Behrens,C., Turner,N., Hoy,A.J., Maghzal,G.J., Stocker,R., Van,R.H., Kraegen,E.W., Cooney,G.J., Richardson,A.R., and James,D.E. (2009). Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 17787-17792.

Hofmann,A.F. and Borgstrom,B. (1962). Physico-chemical state of lipids in intestinal content during their digestion and absorption. *Fed. Proc.* 21, 43-50.

Hojjati,M.R., Li,Z., and Jiang,X.C. (2005). Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1737, 44-51.

Holland,W.L., Bikman,B.T., Wang,L.P., Yuguang,G., Sargent,K.M., Bulchand,S., Knotts,T.A., Shui,G., Clegg,D.J., Wenk,M.R., Pagliassotti,M.J., Scherer,P.E., and Summers,S.A. (2011). Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Invest* 121, 1858-1870.

Holland,W.L., Brozinick,J.T., Wang,L.P., Hawkins,E.D., Sargent,K.M., Liu,Y., Narra,K., Hoehn,K.L., Knotts,T.A., Siesky,A., Nelson,D.H., Karathanasis,S.K., Fontenot,G.K., Birnbaum,M.J., and Summers,S.A. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5, 167-179.

Holland,W.L. and Summers,S.A. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr. Rev.* 29, 381-402.



- Holloway,G.P., Jain,S.S., Bezaire,V., Han,X.X., Glatz,J.F., Luiken,J.J., Harper,M.E., and Bonen,A. (2009). FAT/CD36-null mice reveal that mitochondrial FAT/CD36 is required to upregulate mitochondrial fatty acid oxidation in contracting muscle. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 297, R960-R967.
- Holloway,G.P., Luiken,J.J., Glatz,J.F., Spriet,L.L., and Bonen,A. (2008). Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol (Oxf)* 194, 293-309.
- Holman,G.D., Kozka,I.J., Clark,A.E., Flower,C.J., Saltis,J., Habberfield,A.D., Simpson,I.A., and Cushman,S.W. (1990). Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 265, 18172-18179.
- Hong,J., Jeppesen,P.B., Nordentoft,I., and Hermansen,K. (2007). Fatty acid-induced effect on glucagon secretion is mediated via fatty acid oxidation. *Diabetes Metab Res. Rev.* 23, 202-210.
- Honkanen,R.E., Codispoti,B.A., Tse,K., Boynton,A.L., and Honkanen,R.E. (1994). Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon* 32, 339-350.
- Hori,H., Sasaoka,T., Ishihara,H., Wada,T., Murakami,S., Ishiki,M., and Kobayashi,M. (2002). Association of SH2-containing inositol phosphatase 2 with the insulin resistance of diabetic db/db mice. *Diabetes* 51, 2387-2394.
- Hotamisligil,G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hotamisligil,G.S., Arner,P., Caro,J.F., Atkinson,R.L., and Spiegelman,B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest* 95, 2409-2415.
- Hotamisligil,G.S. and Erbay,E. (2008). Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 923-934.
- Hotamisligil,G.S., Peraldi,P., Budavari,A., Ellis,R., White,M.F., and Spiegelman,B.M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665-668.
- Hotamisligil,G.S., Shargill,N.S., and Spiegelman,B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hotamisligil,G.S. and Spiegelman,B.M. (1994). Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43, 1271-1278.
- Hresko,R.C. and Mueckler,M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 40406-40416.
- Hu,W., Ross,J., Geng,T., Brice,S.E., and Cowart,L.A. (2011). Differential regulation of dihydroceramide desaturase by palmitate versus monounsaturated fatty acids: implications for insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 286, 16596-16605.
- Huang,C., Thirone,A.C., Huang,X., and Klip,A. (2005). Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in I6 myotubes. *J. Biol. Chem.* 280, 19426-19435.

- Huitema,K., van den Dikkenberg,J., Brouwers,J.F., and Holthuis,J.C. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 23, 33-44.
- Hunnicut,J.W., Hardy,R.W., Williford,J., and McDonald,J.M. (1994). Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Diabetes* 43, 540-545.
- Ichikawa,S. and Hirabayashi,Y. (1998). Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 8, 198-202.
- Iglesias,T., Cabrera-Poch,N., Mitchell,M.P., Naven,T.J., Rozengurt,E., and Schiavo,G. (2000). Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J. Biol. Chem.* 275, 40048-40056.
- Ijuin,T. and Takenawa,T. (2012). Regulation of insulin signaling and glucose transporter 4 (GLUT4) exocytosis by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) phosphatase, skeletal muscle, and kidney enriched inositol polyphosphate phosphatase (SKIP). *J. Biol. Chem.* 287, 6991-6999.
- Inukai,K., Anai,M., Van,B.E., Hosaka,T., Katagiri,H., Funaki,M., Fukushima,Y., Ogihara,T., Yazaki,Y., Kikuchi, Oka,Y., and Asano,T. (1996). A novel 55-kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternative splicing of the p85alpha gene. *J. Biol. Chem.* 271, 5317-5320.
- Ishizuka,T., Cooper,D.R., Hernandez,H., Buckley,D., Standaert,M., and Farese,R.V. (1990). Effects of insulin on diacylglycerol-protein kinase C signaling in rat diaphragm and soleus muscles and relationship to glucose transport. *Diabetes* 39, 181-190.
- Itani,S.I., Ruderman,N.B., Schmieder,F., and Boden,G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Diabetes* 51, 2005-2011.
- Ito,H., Murakami,M., Furuhashi,A., Gao,S., Yoshida,K., Sobue,S., Hagiwara,K., Takagi,A., Kojima,T., Suzuki,M., Banno,Y., Tanaka,K., Tamiya-Koizumi,K., Kyogashima,M., Nozawa,Y., and Murate,T. (2009). Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 gene expression of a human breast cancer cell line, MCF-7, induced by the anti-cancer drug, daunorubicin. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 681-690.
- James,D.E., Kraegen,E.W., and Chisholm,D.J. (1985). Muscle glucose metabolism in exercising rats: comparison with insulin stimulation. *Am. J. Physiol* 248, E575-E580.
- Janssens,P.A. and Maher,F. (1986). Glucagon and insulin regulate in vitro hepatic glycogenolysis in the axolotl *Ambystoma mexicanum* via changes in tissue cyclic AMP concentration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61, 64-70.
- JeBailey,L., Rudich,A., Huang,X., Di Ciano-Oliveira,C., Kapus,A., and Klip,A. (2004). Skeletal muscle cells and adipocytes differ in their reliance on TC10 and Rac for insulin-induced actin remodeling. *Mol. Endocrinol.* 18, 359-372.
- JeBailey,L., Wanono,O., Niu,W., Roessler,J., Rudich,A., and Klip,A. (2007). Ceramide- and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent Rac-activation and actin remodeling in muscle cells. *Diabetes* 56, 394-403.
- Jeckel,D., Karrenbauer,A., Burger,K.N., van,M.G., and Wieland,F. (1992). Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J. Cell Biol.* 117, 259-267.

- Jenkins, R.W., Canals, D., and Hannun, Y.A. (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal.* 21, 836-846.
- Jeppesen, J., Albers, P.H., Rose, A.J., Birk, J.B., Schjerling, P., Dzamko, N., Steinberg, G.R., and Kiens, B. (2011). Contraction-induced skeletal muscle FAT/CD36 trafficking and FA uptake is AMPK independent. *J. Lipid Res.* 52, 699-711.
- Jiang, Z.Y., Zhou, Q.L., Coleman, K.A., Chouinard, M., Boese, Q., and Czech, M.P. (2003). Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7569-7574.
- Joost, H.G., Bell, G.I., Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chen, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S., and Thorens, B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 282, E974-E976.
- Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., and Inokuchi, J. (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 13678-13683.
- Kaddai, V., Le Marchand-Brustel, Y., and Cormont, M. (2008). Rab proteins in endocytosis and Glut4 trafficking. *Acta Physiol (Oxf)* 192, 75-88.
- Kanety, H., Hemi, R., Papa, M.Z., and Karasik, A. (1996). Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.* 271, 9895-9897.
- Karlsson, K.A. (1989). Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 309-350.
- Karpe, F., Bell, M., Bjorkegren, J., and Hamsten, A. (1995). Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 199-207.
- Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., and Blumberg, R.S. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., and Waterfield, M.D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 615-675.
- Katz, A., Broberg, S., Sahlin, K., and Wahren, J. (1986). Leg glucose uptake during maximal dynamic exercise in humans. *Am. J. Physiol* 251, E65-E70.
- Kawanishi, M., Tamori, Y., Okazawa, H., Araki, S., Shinoda, H., and Kasuga, M. (2000). Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J. Biol. Chem.* 275, 8240-8247.
- Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., and Hanada, K. (2006). Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.* 281, 30279-30288.

- Kim,J.J. and Sears,D.D. (2010). TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2010.
- Kim,J.K., Gimeno,R.E., Higashimori,T., Kim,H.J., Choi,H., Punreddy,S., Mozell,R.L., Tan,G., Stricker-Krongrad,A., Hirsch,D.J., Fillmore,J.J., Liu,Z.X., Dong,J., Cline,G., Stahl,A., Lodish,H.F., and Shulman,G.I. (2004). Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J. Clin. Invest* 113, 756-763.
- Kim,T.S. and Freake,H.C. (1996). High carbohydrate diet and starvation regulate lipogenic mRNA in rats in a tissue-specific manner. *J. Nutr.* 126, 611-617.
- Kim,W.J., Okimoto,R.A., Purton,L.E., Goodwin,M., Haserlat,S.M., Dayyani,F., Sweetser,D.A., McClatchey,A.I., Bernard,O.A., Look,A.T., Bell,D.W., Scadden,D.T., and Haber,D.A. (2008). Mutations in the neutral sphingomyelinase gene SMPD3 implicate the ceramide pathway in human leukemias. *Blood* 111, 4716-4722.
- Kimura,A., Mora,S., Shigematsu,S., Pessin,J.E., and Saltiel,A.R. (2002). The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277, 30153-30158.
- Kimura,T., Sato,K., Malchinkhuu,E., Tomura,H., Tamama,K., Kuwabara,A., Murakami,M., and Okajima,F. (2003). High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1283-1288.
- Kinoshita,K., Nemoto,T., Nabeshima,K., Kondoh,H., Niwa,H., and Yanagida,M. (1996). The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatase 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes Cells* 1, 29-45.
- Kitatani,K., Idkowiak-Baldys,J., and Hannun,Y.A. (2008). The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 20, 1010-1018.
- Kojima,S., Ueno,N., Asakawa,A., Sagiya,K., Naruo,T., Mizuno,S., and Inui,A. (2007). A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. *Peptides* 28, 459-463.
- Kolesnick,R.N. (1987). 1,2-Diacylglycerols but not phorbol esters stimulate sphingomyelin hydrolysis in GH3 pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 262, 16759-16762.
- Kolter,T., Proia,R.L., and Sandhoff,K. (2002). Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 25859-25862.
- Kolter,T. and Sandhoff,K. (2005). Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 81-103.
- Kotani,K., Carozzi,A.J., Sakaue,H., Hara,K., Robinson,L.J., Clark,S.F., Yonezawa,K., James,D.E., and Kasuga,M. (1995). Requirement for phosphoinositide 3-kinase in insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 343-348.
- Kotani,K., Ogawa,W., Matsumoto,M., Kitamura,T., Sakaue,H., Hino,Y., Miyake,K., Sano,W., Akimoto,K., Ohno,S., and Kasuga,M. (1998). Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol.* 18, 6971-6982.
- Kowalski,G.M., Carey,A.L., Selathurai,A., Kingwell,B.A., and Bruce,C.R. (2013). Plasma sphingosine-1-phosphate is elevated in obesity. *PLoS. One.* 8, e72449.

Kristiansen,S., Hargreaves,M., and Richter,E.A. (1996). Exercise-induced increase in glucose transport, GLUT-4, and VAMP-2 in plasma membrane from human muscle. *Am. J. Physiol* 270, E197-E201.

Kubo,K. and Foley,J.E. (1986). Rate-limiting steps for insulin-mediated glucose uptake into perfused rat hindlimb. *Am. J. Physiol* 250, E100-E102.

Kubota,N., Tobe,K., Terauchi,Y., Eto,K., Yamauchi,T., Suzuki,R., Tsubamoto,Y., Komeda,K., Nakano,R., Miki,H., Satoh,S., Sekihara,H., Sciacchitano,S., Lesniak,M., Aizawa,S., Nagai,R., Kimura,S., Akanuma,Y., Taylor,S.I., and Kadowaki,T. (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880-1889.

Kudo,N., Kumagai,K., Tomishige,N., Yamaji,T., Wakatsuki,S., Nishijima,M., Hanada,K., and Kato,R. (2008). Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 488-493.

Kumagai,K., Kawano,M., Shinkai-Ouchi,F., Nishijima,M., and Hanada,K. (2007). Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT. *J. Biol. Chem.* 282, 17758-17766.

Kumagai,K., Yasuda,S., Okemoto,K., Nishijima,M., Kobayashi,S., and Hanada,K. (2005). CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J. Biol. Chem.* 280, 6488-6495.

Lambert,J.E. and Parks,E.J. (2012). Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 721-726.

Lamour,N.F. and Chalfant,C.E. (2005). Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation. *Mol. Interv.* 5, 358-367.

Lau,J., Borjesson,A., Holstad,M., and Sandler,S. (2006). Prolactin regulation of the expression of TNF-alpha, IFN-gamma and IL-10 by splenocytes in murine multiple low dose streptozotocin diabetes. *Immunol. Lett.* 102, 25-30.

Le,S.H., Milstien,S., and Spiegel,S. (2004). Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J. Cell Biochem.* 92, 882-899.

Lee,T.H. and Linstedt,A.D. (2000). Potential role for protein kinases in regulation of bidirectional endoplasmic reticulum-to-Golgi transport revealed by protein kinase inhibitor H89. *Mol. Biol. Cell* 11, 2577-2590.

Leger,C. (1984). [Recent findings on pancreatic lipase and colipase]. *Diabete Metab* 10, 52-62.

Legrand-Poels,S., Esser,N., L'homme,L., Scheen,A., Paquot,N., and Piette,J. (2014). Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochem. Pharmacol.*

Leloup,C., Arluison,M., Kassis,N., Lepetit,N., Cartier,N., Ferre,P., and Penicaud,L. (1996). Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 38, 45-53.

Lessard,S.J., Rivas,D.A., Chen,Z.P., Bonen,A., Febbraio,M.A., Reeder,D.W., Kemp,B.E., Yaspelkis,B.B., III, and Hawley,J.A. (2007). Tissue-specific effects of rosiglitazone and exercise in the treatment of lipid-induced insulin resistance. *Diabetes* 56, 1856-1864.

- Levine, T.P. and Munro, S. (2002). Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr. Biol.* 12, 695-704.
- Li, D.M. and Sun, H. (1997). TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 57, 2124-2129.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., and Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Li, J.F., Qu, F., Zheng, S.J., Wu, H.L., Liu, M., Liu, S., Ren, Y., Ren, F., Chen, Y., Duan, Z.P., and Zhang, J.L. (2014a). Elevated plasma sphingomyelin (d18:1/22:0) is closely related to hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
- Li, Q., Zhu, X., Ishikura, S., Zhang, D., Gao, J., Sun, Y., Contreras-Ferrat, A., Foley, K.P., Lavandero, S., Yao, Z., Bilan, P.J., Klip, A., and Niu, W. (2014b). Ca<sup>2+</sup>(+) signals promote GLUT4 exocytosis and reduce its endocytosis in muscle cells. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 307, E209-E224.
- Li, Z., Li, Y., Chakraborty, M., Fan, Y., Bui, H.H., Peake, D.A., Kuo, M.S., Xiao, X., Cao, G., and Jiang, X.C. (2009). Liver-specific deficiency of serine palmitoyltransferase subunit 2 decreases plasma sphingomyelin and increases apolipoprotein E levels. *J. Biol. Chem.* 284, 27010-27019.
- Lim, J.H., Lee, H.J., Ho, J.M., and Song, J. (2009). Coupling mitochondrial dysfunction to endoplasmic reticulum stress response: a molecular mechanism leading to hepatic insulin resistance. *Cell Signal.* 21, 169-177.
- Lin, X., Taguchi, A., Park, S., Kushner, J.A., Li, F., Li, Y., and White, M.F. (2004). Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J. Clin. Invest* 114, 908-916.
- Lioubin, M.N., Algate, P.A., Tsai, S., Carlberg, K., Aebersold, A., and Rohrschneider, L.R. (1996). p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev.* 10, 1084-1095.
- Litherland, G.J., Hajdich, E., and Hundal, H.S. (2001). Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues (review). *Mol. Membr. Biol.* 18, 195-204.
- Liu, H., Chakravarty, D., Maceyka, M., Milstien, S., and Spiegel, S. (2002a). Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71, 493-511.
- Liu, J., DeYoung, S.M., Hwang, J.B., O'Leary, E.E., and Saltiel, A.R. (2003). The roles of Cbl-b and c-Cbl in insulin-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem.* 278, 36754-36762.
- Liu, J., Kimura, A., Baumann, C.A., and Saltiel, A.R. (2002b). APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol.* 22, 3599-3609.
- Liu, L., Damen, J.E., Hughes, M.R., Babic, I., Jirik, F.R., and Krystal, G. (1997). The Src homology 2 (SH2) domain of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) is essential for tyrosine phosphorylation of SHIP, its association with Shc, and its induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 8983-8988.

- Liu, L.Z., Cheung, S.C., Lan, L.L., Ho, S.K., Chan, J.C., and Tong, P.C. (2010). The pivotal role of protein kinase C zeta (PKCzeta) in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated glucose uptake in muscle cells. *Cell Signal*. 22, 1513-1522.
- Liu, Q., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Wakeham, A., Itie, A., Dumont, D.J., and Penninger, J.M. (1999a). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev*. 13, 786-791.
- Liu, S.C., Wang, Q., Lienhard, G.E., and Keller, S.R. (1999b). Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J. Biol. Chem*. 274, 18093-18099.
- Lizcano, J.M. and Alessi, D.R. (2002). The insulin signalling pathway. *Curr. Biol*. 12, R236-R238.
- Lloyd, A.C., Carpenter, C.A., and Saggerson, E.D. (1986). Intertissue differences in the hysteretic behaviour of carnitine palmitoyltransferase in the presence of malonyl-CoA. *Biochem. J*. 237, 289-291.
- Lobo, S. and Bernlohr, D.A. (2007). Fatty acid transport in adipocytes and the development of insulin resistance. *Novartis. Found. Symp*. 286, 113-121.
- Loddick, S.A., MacKenzie, A., and Rothwell, N.J. (1996). An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat. *Neuroreport* 7, 1465-1468.
- Lonnroth, P., Digirolamo, M., Krotkiewski, M., and Smith, U. (1983). Insulin binding and responsiveness in fat cells from patients with reduced glucose tolerance and type II diabetes. *Diabetes* 32, 748-754.
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S., and Stanley, W.C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 90, 207-258.
- Lu, M., Wan, M., Leavens, K.F., Chu, Q., Monks, B.R., Fernandez, S., Ahima, R.S., Ueki, K., Kahn, C.R., and Birnbaum, M.J. (2012). Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nat. Med*. 18, 388-395.
- Luginbuhl, A.J., Dudley, G.A., and Staron, R.S. (1984). Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. *Histochemistry* 81, 55-58.
- Ma, M.M., Chen, J.L., Wang, G.G., Wang, H., Lu, Y., Li, J.F., Yi, J., Yuan, Y.J., Zhang, Q.W., Mi, J., Wang, L.S., Duan, H.F., and Wu, C.T. (2007). Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice. *Diabetologia* 50, 891-900.
- Maehama, T. and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem*. 273, 13375-13378.
- Mahfouz, R., Khoury, R., Blachnio-Zabielska, A., Turban, S., Loiseau, N., Lipina, C., Stretton, C., Bourron, O., Ferre, P., Foufelle, F., Hundal, H.S., and Hajduch, E. (2014a). Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight. *PLoS. One*. 9, e101865.
- Mahfouz, R., Khoury, R., Blachnio-Zabielska, A., Turban, S., Loiseau, N., Lipina, C., Stretton, C., Bourron, O., Ferre, P., Foufelle, F., Hundal, H.S., and Hajduch, E. (2014b). Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight. *PLoS. One*. 9, e101865.

- Manford,A.G., Stefan,C.J., Yuan,H.L., Macgurn,J.A., and Emr,S.D. (2012). ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev. Cell* 23, 1129-1140.
- Marchesini,N. and Hannun,Y.A. (2004). Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* 82, 27-44.
- Marette,A., Richardson,J.M., Ramlal,T., Balon,T.W., Vranic,M., Pessin,J.E., and Klip,A. (1992). Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am. J. Physiol* 263, C443-C452.
- Marks,D.L., Bittman,R., and Pagano,R.E. (2008). Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells. *Histochem. Cell Biol.* 130, 819-832.
- Marliss,E.B., Girardier,L., Seydoux,J., Wollheim,C.B., Kanazawa,Y., Orci,L., Renold,A.E., and Porte,D., Jr. (1973). Glucagon release induced by pancreatic nerve stimulation in the dog. *J. Clin. Invest* 52, 1246-1259.
- Mashek,D.G., Li,L.O., and Coleman,R.A. (2006). Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *J. Lipid Res.* 47, 2004-2010.
- Mastick,C.C., Brady,M.J., and Saltiel,A.R. (1995). Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J. Cell Biol.* 129, 1523-1531.
- Matsuoka,K., Orci,L., Amherdt,M., Bednarek,S.Y., Hamamoto,S., Schekman,R., and Yeung,T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93, 263-275.
- Mauro,A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493-495.
- McCurdy,C.E. and Klemm,D.J. (2013). Adipose tissue insulin sensitivity and macrophage recruitment: Does PI3K pick the pathway? *Adipocyte.* 2, 135-142.
- McEwen,B.S. and Reagan,L.P. (2004). Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 13-24.
- McGarry,J.D. (2001). Travels with carnitine palmitoyltransferase I: from liver to germ cell with stops in between. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 241-245.
- McGee,S.L. (2009). Signalling GLUTtony keeps the sugar coming through glucose transporter expression. *J. Physiol* 587, 4133-4134.
- Menendez,M., Solis,D., Usobiaga,P., and Laynez,J. (1985). AMP interaction sites in glycogen phosphorylase b. A thermodynamic analysis. *Biophys. Chem.* 21, 249-260.
- Merrill,A.H., Jr. (2002). De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 25843-25846.
- Merrill,A.H., Jr., Nixon,D.W., and Williams,R.D. (1985). Activities of serine palmitoyltransferase (3-ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues. *J. Lipid Res.* 26, 617-622.
- Merry,T.L., Lynch,G.S., and McConell,G.K. (2010). Downstream mechanisms of nitric oxide-mediated skeletal muscle glucose uptake during contraction. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 299, R1656-R1665.



- Miklosz,A., Lukaszuk,B., Baranowski,M., Gorski,J., and Chabowski,A. (2013). Effects of inhibition of serine palmitoyltransferase (SPT) and sphingosine kinase 1 (SphK1) on palmitate induced insulin resistance in L6 myotubes. *PLoS. One.* *8*, e85547.
- Milger,K., Herrmann,T., Becker,C., Gotthardt,D., Zickwolf,J., Ehehalt,R., Watkins,P.A., Stremmel,W., and Fullekrug,J. (2006). Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J. Cell Sci.* *119*, 4678-4688.
- Miller,E.A., Beilharz,T.H., Malkus,P.N., Lee,M.C., Hamamoto,S., Orci,L., and Schekman,R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* *114*, 497-509.
- Miller,S.D., Greene,C.M., McLean,C., Lawless,M.W., Taggart,C.C., O'Neill,S.J., and McElvaney,N.G. (2007). Tauroursodeoxycholic acid inhibits apoptosis induced by Z alpha-1 antitrypsin via inhibition of Bad. *Hepatology* *46*, 496-503.
- Mithieux,G., Andreelli,F., and Magnan,C. (2009). Intestinal gluconeogenesis: key signal of central control of energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* *12*, 419-423.
- Mithieux,G., Bady,I., Gautier,A., Croset,M., Rajas,F., and Zitoun,C. (2004). Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *286*, E370-E375.
- Mithieux,G., Gautier-Stein,A., Rajas,F., and Zitoun,C. (2006). Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* *143*, 195-200.
- Mitra,P., Oskeritzian,C.A., Payne,S.G., Beaven,M.A., Milstien,S., and Spiegel,S. (2006). Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 16394-16399.
- Mitra,P., Zheng,X., and Czech,M.P. (2004). RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and CrkII function in the regulation of GLUT4 by insulin. *J. Biol. Chem.* *279*, 37431-37435.
- Mitsutake,S., Date,T., Yokota,H., Sugiura,M., Kohama,T., and Igarashi,Y. (2012). Ceramide kinase deficiency improves diet-induced obesity and insulin resistance. *FEBS Lett.* *586*, 1300-1305.
- Mitsutake,S., Zama,K., Yokota,H., Yoshida,T., Tanaka,M., Mitsui,M., Ikawa,M., Okabe,M., Tanaka,Y., Yamashita,T., Takemoto,H., Okazaki,T., Watanabe,K., and Igarashi,Y. (2011a). Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* *286*, 28544-28555.
- Mitsutake,S., Zama,K., Yokota,H., Yoshida,T., Tanaka,M., Mitsui,M., Ikawa,M., Okabe,M., Tanaka,Y., Yamashita,T., Takemoto,H., Okazaki,T., Watanabe,K., and Igarashi,Y. (2011b). Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* *286*, 28544-28555.
- Molero,J.C., Jensen,T.E., Withers,P.C., Couzens,M., Herzog,H., Thien,C.B., Langdon,W.Y., Walder,K., Murphy,M.A., Bowtell,D.D., James,D.E., and Cooney,G.J. (2004). c-Cbl-deficient mice have reduced adiposity, higher energy expenditure, and improved peripheral insulin action. *J. Clin. Invest* *114*, 1326-1333.
- Molina,J.M., Ciaraldi,T.P., Brady,D., and Olefsky,J.M. (1989). Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* *38*, 991-995.

- Moodie, S.A., Alleman-Sposeto, J., and Gustafson, T.A. (1999). Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 11186-11193.
- Moore, M.L., Park, E.A., and McMillin, J.B. (2003). Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-1 $\beta$  expression by PGC-1. *J. Biol. Chem.* 278, 17263-17268.
- Morino, K., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2, S9-S15.
- Mossessova, E., Bickford, L.C., and Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* 114, 483-495.
- Mu, J., Brozinick, J.T., Jr., Valladares, O., Bucan, M., and Birnbaum, M.J. (2001). A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell* 7, 1085-1094.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., and Lodish, H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945.
- Mullen, T.D., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2012). Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* 441, 789-802.
- Muoio, D.M. and Newgard, C.B. (2008). Fatty acid oxidation and insulin action: when less is more. *Diabetes* 57, 1455-1456.
- Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M., and Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 11282-11287.
- Murase, K., Odaka, H., Suzuki, M., Tayuki, N., and Ikeda, H. (1998). Pioglitazone time-dependently reduces tumour necrosis factor- $\alpha$  level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* 41, 257-264.
- Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., Gorgun, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* 140, 338-348.
- Nakamuta, M., Kohjima, M., Morizono, S., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Miyagi, I., and Enjoji, M. (2005). Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* 16, 631-635.
- Nakashima, N., Sharma, P.M., Imamura, T., Bookstein, R., and Olefsky, J.M. (2000). The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 12889-12895.
- Napal, L., Dai, J., Treber, M., Haro, D., Marrero, P.F., and Woldegiorgis, G. (2003). A single amino acid change (substitution of the conserved Glu-590 with alanine) in the C-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase I increases its malonyl-CoA sensitivity close to that observed with the muscle isoform of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 278, 34084-34089.
- Nesher, R., Karl, I.E., and Kipnis, D.M. (1985). Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am. J. Physiol* 249, C226-C232.

- Newsom,S.A., Schenk,S., Li,M., Everett,A.C., and Horowitz,J.F. (2011). High fatty acid availability after exercise alters the regulation of muscle lipid metabolism. *Metabolism* 60, 852-859.
- Nguyen,M.T., Favelyukis,S., Nguyen,A.K., Reichart,D., Scott,P.A., Jenn,A., Liu-Bryan,R., Glass,C.K., Neels,J.G., and Olefsky,J.M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 35279-35292.
- Nguyen,M.T., Satoh,H., Favelyukis,S., Babendure,J.L., Imamura,T., Sbodio,J.I., Zalevsky,J., Dahiyat,B.I., Chi,N.W., and Olefsky,J.M. (2005). JNK and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 35361-35371.
- Nhek,S., Ngo,M., Yang,X., Ng,M.M., Field,S.J., Asara,J.M., Ridgway,N.D., and Toker,A. (2010). Regulation of oxysterol-binding protein Golgi localization through protein kinase D-mediated phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 21, 2327-2337.
- Nikolova-Karakashian,M., Karakashian,A., and Rutkute,K. (2008). Role of neutral sphingomyelinases in aging and inflammation. *Subcell. Biochem.* 49, 469-486.
- Norquay,L.D., D'Aquino,K.E., Opare-Addo,L.M., Kuznetsova,A., Haas,M., Bluestone,J.A., and White,M.F. (2009). Insulin receptor substrate-2 in beta-cells decreases diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* 150, 4531-4540.
- Nozaki,S., Takeda,T., Kitaura,T., Takenaka,N., Kataoka,T., and Satoh,T. (2013). Akt2 regulates Rac1 activity in the insulin-dependent signaling pathway leading to GLUT4 translocation to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *Cell Signal.* 25, 1361-1371.
- Nyomba,B.L., Ossowski,V.M., Bogardus,C., and Mott,D.M. (1990). Insulin-sensitive tyrosine kinase: relationship with in vivo insulin action in humans. *Am. J. Physiol* 258, E964-E974.
- Nystrom,F.H., Chen,H., Cong,L.N., Li,Y., and Quon,M.J. (1999). Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol. Endocrinol.* 13, 2013-2024.
- Oikawa,D., Kimata,Y., Takeuchi,M., and Kohno,K. (2005). An essential dimer-forming subregion of the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1. *Biochem. J.* 391, 135-142.
- Oka,N., Yamamoto,M., Schwencke,C., Kawabe,J., Ebina,T., Ohno,S., Couet,J., Lisanti,M.P., and Ishikawa,Y. (1997). Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J. Biol. Chem.* 272, 33416-33421.
- Okajima,F. (2002). Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 132-137.
- Olefsky,J.M. and Glass,C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol* 72, 219-246.
- Olivera,A. and Spiegel,S. (2001). Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins* 64, 123-134.

- Olofsson, C.S., Salehi, A., Gopel, S.O., Holm, C., and Rorsman, P. (2004). Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium. *Diabetes* 53, 2836-2843.
- Orava, J., Nuutila, P., Lidell, M.E., Oikonen, V., Nojonen, T., Viljanen, T., Scheinin, M., Taittonen, M., Niemi, T., Enerback, S., and Virtanen, K.A. (2011). Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab* 14, 272-279.
- Ortmeyer, H.K. (1997). Insulin decreases skeletal muscle cAMP-dependent protein kinase (PKA) activity in normal monkeys and increases PKA activity in insulin-resistant rhesus monkeys. *J. Basic Clin. Physiol Pharmacol.* 8, 223-235.
- Osaki, M., Oshimura, M., and Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 9, 667-676.
- Ouellet, V., Labbe, S.M., Blondin, D.P., Phoenix, S., Guerin, B., Haman, F., Turcotte, E.E., Richard, D., and Carpentier, A.C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest* 122, 545-552.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.
- Paglialunga, S., van, B.B., Bosma, M., Valdecantos, M.P., Amengual-Cladera, E., Jorgensen, J.A., van, B.D., den Hartog, G.J., Ouwens, D.M., Briede, J.J., Schrauwen, P., and Hoeks, J. (2012). Targeting of mitochondrial reactive oxygen species production does not avert lipid-induced insulin resistance in muscle tissue from mice. *Diabetologia* 55, 2759-2768.
- Parker, R.A., Flint, O.P., Mulvey, R., Elosua, C., Wang, F., Fenderson, W., Wang, S., Yang, W.P., and Noor, M.A. (2005). Endoplasmic reticulum stress links dyslipidemia to inhibition of proteasome activity and glucose transport by HIV protease inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 67, 1909-1919.
- Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H., and Stralfors, P. (2001). Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.* 276, 9670-9678.
- Partanen, S.T., Novikov, D.K., Popov, A.N., Mursula, A.M., Hiltunen, J.K., and Wierenga, R.K. (2004). The 1.3 Å crystal structure of human mitochondrial Delta3-Delta2-enoyl-CoA isomerase shows a novel mode of binding for the fatty acyl group. *J. Mol. Biol.* 342, 1197-1208.
- Patti, M.E. and Corvera, S. (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 31, 364-395.
- Paz, K., Hemi, R., Leroith, D., Karasik, A., Elhanany, E., Kanety, H., and Zick, Y. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 29911-29918.
- Paz, K., Voliovitch, H., Hadari, Y.R., Roberts, C.T., Jr., LeRoith, D., and Zick, Y. (1996). Interaction between the insulin receptor and its downstream effectors. Use of individually expressed receptor domains for structure/function analysis. *J. Biol. Chem.* 271, 6998-7003.

- Peinado-Onsurbe, J., Staels, B., Deeb, S., and Auwerx, J. (1992). Lipoprotein lipase expression in undifferentiated hepatoma cells is regulated by progesterone and protein kinase A. *Biochemistry* 31, 10121-10128.
- Peraldi, P. and Spiegelman, B.M. (1997). [TNF- $\alpha$ : molecular tie between obesity and insulin resistance]. *Journ. Annu. Diabetol. Hotel Dieu* 149-159.
- Perreault, L., Bergman, B.C., Hunerdosse, D.M., and Eckel, R.H. (2010). Altered intramuscular lipid metabolism relates to diminished insulin action in men, but not women, in progression to diabetes. *Obesity*. (Silver. Spring) 18, 2093-2100.
- Perry, D.K. and Hannun, Y.A. (1998). The role of ceramide in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 233-243.
- Plomgaard, P., Bouzakri, K., Krogh-Madsen, R., Mittendorfer, B., Zierath, J.R., and Pedersen, B.K. (2005). Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 54, 2939-2945.
- Ploug, T., Galbo, H., and Richter, E.A. (1984). Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin. *Am. J. Physiol* 247, E726-E731.
- Ploug, T., Galbo, H., Vinten, J., Jorgensen, M., and Richter, E.A. (1987). Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. *Am. J. Physiol* 253, E12-E20.
- Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E., and Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 1563-1568.
- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 451-477.
- Ponting, C.P. and Aravind, L. (1999). START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem. Sci.* 24, 130-132.
- Powell, D.J., Hajduch, E., Kular, G., and Hundal, H.S. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKC $\zeta$ -dependent mechanism. *Mol. Cell Biol.* 23, 7794-7808.
- Powell, D.J., Turban, S., Gray, A., Hajduch, E., and Hundal, H.S. (2004a). Intracellular ceramide synthesis and protein kinase  $\zeta$  activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem. J.* 382, 619-629.
- Powell, D.J., Turban, S., Gray, A., Hajduch, E., and Hundal, H.S. (2004b). Intracellular ceramide synthesis and protein kinase  $\zeta$  activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem. J.* 382, 619-629.
- Powers, T. and Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10, 987-1000.
- Pralhada, R.R., Vaidyanathan, N., Rengasamy, M., Mammen, O.A., Somaiya, N., and Jagannath, M.R. (2013). Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *J. Lipids* 2013, 178910.

- Qi,Y., Chen,J., Lay,A., Don,A., Vadas,M., and Xia,P. (2013). Loss of sphingosine kinase 1 predisposes to the onset of diabetes via promoting pancreatic beta-cell death in diet-induced obese mice. *FASEB J.* 27, 4294-4304.
- Quesada,I., Tuduri,E., Ripoll,C., and Nadal,A. (2008). Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J. Endocrinol.* 199, 5-19.
- Raichur,S., Wang,S.T., Chan,P.W., Li,Y., Ching,J., Chaurasia,B., Dogra,S., Ohman,M.K., Takeda,K., Sugii,S., Pewzner-Jung,Y., Futerman,A.H., and Summers,S.A. (2014). CerS2 Haploinsufficiency Inhibits beta-Oxidation and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Cell Metab* 20, 687-695.
- Ralston,E., Beushausen,S., and Ploug,T. (1994). Expression of the synaptic vesicle proteins VAMPs/synaptobrevins 1 and 2 in non-neural tissues. *J. Biol. Chem.* 269, 15403-15406.
- Randle,P.J., GARLAND,P.B., HALES,C.N., and NEWSHOLME,E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.
- Rapizzi,E., Taddei,M.L., Fiaschi,T., Donati,C., Bruni,P., and Chiarugi,P. (2009). Sphingosine 1-phosphate increases glucose uptake through trans-activation of insulin receptor. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 3207-3218.
- Rawat,R., Cohen,T.V., Ampong,B., Francia,D., Henriques-Pons,A., Hoffman,E.P., and Nagaraju,K. (2010). Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 176, 2891-2900.
- Raya,A., Revert,F., Navarro,S., and Saus,J. (1999). Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human goodpasture antigen. *J. Biol. Chem.* 274, 12642-12649.
- Raya,A., Revert-Ros,F., Martinez-Martinez,P., Navarro,S., Rosello,E., Vieites,B., Granero,F., Forteza,J., and Saus,J. (2000). Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 40392-40399.
- Razani,B., Woodman,S.E., and Lisanti,M.P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 54, 431-467.
- Ren,J.M., Marshall,B.A., Gulve,E.A., Gao,J., Johnson,D.W., Holloszy,J.O., and Mueckler,M. (1993). Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 268, 16113-16115.
- Rennie,M.J., Wackerhage,H., Spangenburg,E.E., and Booth,F.W. (2004). Control of the size of the human muscle mass. *Annu. Rev. Physiol* 66, 799-828.
- Ribon,V. and Saltiel,A.R. (1997). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 324 ( Pt 3), 839-845.
- Riboni,L., Bassi,R., Caminiti,A., Prinetti,A., Viani,P., and Tettamanti,G. (1998). Metabolic fate of exogenous sphingosine in neuroblastoma neuro2A cells. Dose-dependence and biological effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845, 46-56.

- Riboni,L., Prinetti,A., Bassi,R., and Tettamanti,G. (1994). Formation of bioactive sphingoid molecules from exogenous sphingomyelin in primary cultures of neurons and astrocytes. *FEBS Lett.* 352, 323-326.
- Riboni,L., Viani,P., Bassi,R., Prinetti,A., and Tettamanti,G. (1997). The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog. Lipid Res.* 36, 153-195.
- Richter,E.A., Derave,W., and Wojtaszewski,J.F. (2001). Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J. Physiol* 535, 313-322.
- Richter,E.A. and Hargreaves,M. (2013). Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev.* 93, 993-1017.
- Richter,E.A., Ploug,T., and Galbo,H. (1985). Increased muscle glucose uptake after exercise. No need for insulin during exercise. *Diabetes* 34, 1041-1048.
- Ridley,A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16, 522-529.
- Rieusset,J., Chauvin,M.A., Durand,A., Bravard,A., Laugerette,F., Michalski,M.C., and Vidal,H. (2012). Reduction of endoplasmic reticulum stress using chemical chaperones or Grp78 overexpression does not protect muscle cells from palmitate-induced insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 439-445.
- Roach,P.J., Depaoli-Roach,A.A., Hurley,T.D., and Tagliabracci,V.S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem. J.* 441, 763-787.
- Roberts,C.K., Barnard,R.J., Scheck,S.H., and Balon,T.W. (1997). Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am. J. Physiol* 273, E220-E225.
- Roden,M. (2001). Non-invasive studies of glycogen metabolism in human skeletal muscle using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 4, 261-266.
- Roden,M., Price,T.B., Perseghin,G., Petersen,K.F., Rothman,D.L., Cline,G.W., and Shulman,G.I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest* 97, 2859-2865.
- Rodriguez,I., Matsuura,K., Ody,C., Nagata,S., and Vassalli,P. (1996). Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J. Exp. Med.* 184, 2067-2072.
- Rohrschneider,L.R., Fuller,J.F., Wolf,I., Liu,Y., and Lucas,D.M. (2000). Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev.* 14, 505-520.
- Romijn,J.A., Coyle,E.F., Sidossis,L.S., Gastaldelli,A., Horowitz,J.F., Endert,E., and Wolfe,R.R. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am. J. Physiol* 265, E380-E391.
- Rose,A.J., Jeppesen,J., Kiens,B., and Richter,E.A. (2009). Effects of contraction on localization of GLUT4 and v-SNARE isoforms in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 297, R1228-R1237.
- Rose,A.J., Kiens,B., and Richter,E.A. (2006). Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J. Physiol* 574, 889-903.

- Rose, A.J. and Richter, E.A. (2005). Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology*. (Bethesda. ) 20, 260-270.
- Rosenson, R.S., Tangney, C.C., Levine, D.M., Parker, T.S., and Gordon, B.R. (2004). Elevated soluble tumor necrosis factor receptor levels in non-obese adults with the atherogenic dyslipoproteinemia. *Atherosclerosis* 177, 77-81.
- Ross, J.S., Hu, W., Rosen, B., Snider, A.J., Obeid, L.M., and Cowart, L.A. (2013). Sphingosine kinase 1 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha in response to free fatty acids and is essential for skeletal muscle interleukin-6 production and signaling in diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* 288, 22193-22206.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
- Rothman, J.E. and Warren, G. (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr. Biol.* 4, 220-233.
- Rouquet, N., Pages, J.C., Molina, T., Briand, P., and Joulin, V. (1996). ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against in vivo liver apoptosis. *Curr. Biol.* 6, 1192-1195.
- Roy, D. and Marette, A. (1996). Exercise induces the translocation of GLUT4 to transverse tubules from an intracellular pool in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 147-152.
- Rudich, A. and Klip, A. (2013). Putting Rac1 on the path to glucose uptake. *Diabetes* 62, 1831-1832.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M.F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* 277, 42394-42398.
- Ruvolo, P.P. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol. Res.* 47, 383-392.
- Ryan, M., McInerney, D., Owens, D., Collins, P., Johnson, A., and Tomkin, G.H. (2000). Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. *QJM.* 93, 85-91.
- Sabin, M.A., Stewart, C.E., Crowne, E.C., Turner, S.J., Hunt, L.P., Welsh, G.I., Grohmann, M.J., Holly, J.M., and Shield, J.P. (2007). Fatty acid-induced defects in insulin signalling, in myotubes derived from children, are related to ceramide production from palmitate rather than the accumulation of intramyocellular lipid. *J. Cell Physiol* 211, 244-252.
- Sajan, M.P., Standaert, M.L., Nimal, S., Varanasi, U., Pastoor, T., Mastorides, S., Braun, U., Leitges, M., and Farese, R.V. (2009). The critical role of atypical protein kinase C in activating hepatic SREBP-1c and NFkappaB in obesity. *J. Lipid Res.* 50, 1133-1145.
- Salinas, M., Lopez-Valdaliso, R., Martin, D., Alvarez, A., and Cuadrado, A. (2000). Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol. Cell Neurosci.* 15, 156-169.
- Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.



Saltiel, A.R. and Pessin, J.E. (2003). Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* 4, 711-716.

Samuel, V.T., Liu, Z.X., Wang, A., Beddow, S.A., Geisler, J.G., Kahn, M., Zhang, X.M., Monia, B.P., Bhanot, S., and Shulman, G.I. (2007). Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest* 117, 739-745.

Samuel, V.T. and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852-871.

Sano, H., Eguez, L., Teruel, M.N., Fukuda, M., Chuang, T.D., Chavez, J.A., Lienhard, G.E., and McGraw, T.E. (2007). Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane. *Cell Metab* 5, 293-303.

Sarkar, A., Sreenivasan, Y., Ramesh, G.T., and Manna, S.K. (2004). beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 33768-33781.

Sasaki, K. and Granner, D.K. (1988). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by insulin and cAMP: reciprocal actions on initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 2954-2958.

Sasaoka, T., Fukui, K., Wada, T., Murakami, S., Kawahara, J., Ishihara, H., Funaki, M., Asano, T., and Kobayashi, M. (2005). Inhibition of endogenous SHIP2 ameliorates insulin resistance caused by chronic insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 48, 336-344.

Sasaoka, T., Hori, H., Wada, T., Ishiki, M., Haruta, T., Ishihara, H., and Kobayashi, M. (2001). SH2-containing inositol phosphatase 2 negatively regulates insulin-induced glycogen synthesis in L6 myotubes. *Diabetologia* 44, 1258-1267.

Sasaoka, T., Wada, T., and Tsuneki, H. (2006). Lipid phosphatases as a possible therapeutic target in cases of type 2 diabetes and obesity. *Pharmacol. Ther.* 112, 799-809.

Scheepers, A., Joost, H.G., and Schurmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 28, 364-371.

Schenk, S., Saberi, M., and Olefsky, J.M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest* 118, 2992-3002.

Schiaffino, S. and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 91, 1447-1531.

Schmitz-Peiffer, C. (2002). Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 146-157.

Schmitz-Peiffer, C., Craig, D.L., and Biden, T.J. (1999a). Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J. Biol. Chem.* 274, 24202-24210.

Schmitz-Peiffer, C., Craig, D.L., and Biden, T.J. (1999b). Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J. Biol. Chem.* 274, 24202-24210.

- Schreurs,M., Kuipers,F., and van der Leij,F.R. (2010). Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes. Rev.* 11, 380-388.
- Schroder,M. and Kaufman,R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739-789.
- Schubert,K.M., Scheid,M.P., and Duronio,V. (2000). Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J. Biol. Chem.* 275, 13330-13335.
- Schulze,H., Michel,C., and van Echten-Deckert,G. (2000). Dihydroceramide desaturase. *Methods Enzymol.* 311, 22-30.
- Schuppel,M., Kurschner,U., Kleuser,U., Schafer-Korting,M., and Kleuser,B. (2008). Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype. *J. Invest Dermatol.* 128, 1747-1756.
- Sciacchitano,S. and Taylor,S.I. (1997). Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrinology* 138, 4931-4940.
- Sebastian,D., Guitart,M., Garcia-Martinez,C., Mauvezin,C., Orellana-Gavalda,J.M., Serra,D., Gomez-Foix,A.M., Hegardt,F.G., and Asins,G. (2009). Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *J. Lipid Res.* 50, 1789-1799.
- Sedaghat,A.R., Sherman,A., and Quon,M.J. (2002). A mathematical model of metabolic insulin signaling pathways. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 283, E1084-E1101.
- Shah,C., Yang,G., Lee,I., Bielawski,J., Hannun,Y.A., and Samad,F. (2008). Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *J. Biol. Chem.* 283, 13538-13548.
- Shaw,C.S., Jones,D.A., and Wagenmakers,A.J. (2008). Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres. *Histochem. Cell Biol.* 129, 65-72.
- She,M., Deng,X., Guo,Z., Laudon,M., Hu,Z., Liao,D., Hu,X., Luo,Y., Shen,Q., Su,Z., and Yin,W. (2009). NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats. *Pharmacol. Res.* 59, 248-253.
- Shimano,H., Yahagi,N., Amemiya-Kudo,M., Hasty,A.H., Osuga,J., Tamura,Y., Shionoiri,F., Iizuka,Y., Ohashi,K., Harada,K., Gotoda,T., Ishibashi,S., and Yamada,N. (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* 274, 35832-35839.
- Shioi,T., McMullen,J.R., Kang,P.M., Douglas,P.S., Obata,T., Franke,T.F., Cantley,L.C., and Izumo,S. (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* 22, 2799-2809.
- Shui,G., Stebbins,J.W., Lam,B.D., Cheong,W.F., Lam,S.M., Gregoire,F., Kusunoki,J., and Wenk,M.R. (2011). Comparative plasma lipidome between human and cynomolgus monkey: are plasma polar lipids good biomarkers for diabetic monkeys? *PLoS. One.* 6, e19731.
- Shulman,G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest* 106, 171-176.

Sidrauski,C. and Walter,P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90, 1031-1039.

Simons,K. and Ikonen,E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

Simons,K. and Toomre,D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.

Smith,E.R. and Merrill,A.H., Jr. (1995). Differential roles of de novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the "burst" of free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and N-acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in culture. *J. Biol. Chem.* 270, 18749-18758.

Smith,R.M., Harada,S., Smith,J.A., Zhang,S., and Jarett,L. (1998). Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signalling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain. *Cell Signal.* 10, 355-362.

Song,X.M., Kawano,Y., Krook,A., Ryder,J.W., Efendic,S., Roth,R.A., Wallberg-Henriksson,H., and Zierath,J.R. (1999). Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. *Diabetes* 48, 664-670.

Souto,R.P., Vallega,G., Wharton,J., Vinten,J., Trantum-Jensen,J., and Pilch,P.F. (2003). Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their dissociation from insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 18321-18329.

Spiegel,S., English,D., and Milstien,S. (2002). Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction. *Trends Cell Biol.* 12, 236-242.

Spiegel,S., Foster,D., and Kolesnick,R. (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 159-167.

Spiegel,S. and Merrill,A.H., Jr. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* 10, 1388-1397.

Spiegel,S. and Milstien,S. (2003). Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1216-1219.

Standaert,M.L., Bandyopadhyay,G., Kanoh,Y., Sajan,M.P., and Farese,R.V. (2001). Insulin and PIP3 activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry* 40, 249-255.

Standaert,M.L., Bandyopadhyay,G., Perez,L., Price,D., Galloway,L., Poklepovic,A., Sajan,M.P., Cenni,V., Sirri,A., Moscat,J., Toker,A., and Farese,R.V. (1999). Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 25308-25316.

Standaert,M.L., Galloway,L., Karnam,P., Bandyopadhyay,G., Moscat,J., and Farese,R.V. (1997). Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J. Biol. Chem.* 272, 30075-30082.

Standaert,M.L., Sajan,M.P., Miura,A., Bandyopadhyay,G., and Farese,R.V. (2004). Requirements for pYXXM motifs in Cbl for binding to the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and Crk, and activation of atypical protein kinase C and glucose transport during insulin action in 3T3/L1 adipocytes. *Biochemistry* 43, 15494-15502.

Steck,P.A., Pershouse,M.A., Jasser,S.A., Yung,W.K., Lin,H., Ligon,A.H., Langford,L.A., Baumgard,M.L., Hattier,T., Davis,T., Frye,C., Hu,R., Swedlund,B., Teng,D.H., and Tavtigian,S.V. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15, 356-362.

Stefan,C.J., Manford,A.G., and Emr,S.D. (2013). ER-PM connections: sites of information transfer and inter-organelle communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 434-442.

Steinberg,S.F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* 88, 1341-1378.

Stengel,A., Goebel,M., Wang,L., Rivier,J., Kobelt,P., Monnikes,H., and Tache,Y. (2010). Selective central activation of somatostatin receptor 2 increases food intake, grooming behavior and rectal temperature in rats. *J. Physiol Pharmacol.* 61, 399-407.

Stienstra,R., van Diepen,J.A., Tack,C.J., Zaki,M.H., van de Veerdonk,F.L., Perera,D., Neale,G.A., Hooiveld,G.J., Hijmans,A., Vroegrijk,I., van den Berg,S., Romijn,J., Rensen,P.C., Joosten,L.A., Netea,M.G., and Kanneganti,T.D. (2011). Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 15324-15329.

Stitt,T.N., Drujan,D., Clarke,B.A., Panaro,F., Timofeyva,Y., Kline,W.O., Gonzalez,M., Yancopoulos,G.D., and Glass,D.J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell* 14, 395-403.

Stockli,J., Fazakerley,D.J., Coster,A.C., Holman,G.D., and James,D.E. (2010). Muscling in on GLUT4 kinetics. *Commun. Integr. Biol.* 3, 260-262.

Stoffel,W., Jenke,B., Block,B., Zumbansen,M., and Koebke,J. (2005). Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 4554-4559.

Stoffel,W., Jenke,B., Holz,B., Binczek,E., Gunter,R.H., Knifka,J., Koebke,J., and Niehoff,A. (2007). Neutral sphingomyelinase (SMPD3) deficiency causes a novel form of chondrodysplasia and dwarfism that is rescued by Col2A1-driven smpd3 transgene expression. *Am. J. Pathol.* 171, 153-161.

Storch,J. and Thumser,A.E. (2010). Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *J. Biol. Chem.* 285, 32679-32683.

Strackowski,M., Kowalska,I., Baranowski,M., Nikolajuk,A., Otziomek,E., Zabielski,P., Adamska,A., Blachnio,A., Gorski,J., and Gorska,M. (2007a). Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 2366-2373.

Strackowski,M., Kowalska,I., Baranowski,M., Nikolajuk,A., Otziomek,E., Zabielski,P., Adamska,A., Blachnio,A., Gorski,J., and Gorska,M. (2007b). Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 2366-2373.

Strackowski,M., Kowalska,I., Nikolajuk,A., Dzienis-Strackowska,S., Kinalska,I., Baranowski,M., Zendzian-Piotrowska,M., Brzezinska,Z., and Gorski,J. (2004). Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes* 53, 1215-1221.

Stratford,S., DeWald,D.B., and Summers,S.A. (2001). Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem. J.* 354, 359-368.

- Stratford,S., Hoehn,K.L., Liu,F., and Summers,S.A. (2004). Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 279, 36608-36615.
- Streeper,R.S., Svitek,C.A., Chapman,S., Greenbaum,L.E., Taub,R., and O'Brien,R.M. (1997). A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* 272, 11698-11701.
- Stretton,C., Evans,A., and Hundal,H.S. (2010). Cellular depletion of atypical PKC $\lambda$  is associated with enhanced insulin sensitivity and glucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 299, E402-E412.
- Strowski,M.Z. and Blake,A.D. (2008). Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Mol. Cell Endocrinol.* 286, 169-179.
- Stuart,C.A., Yin,D., Howell,M.E., Dykes,R.J., Laffan,J.J., and Ferrando,A.A. (2006). Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 291, E1067-E1073.
- Summers,S.A. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* 45, 42-72.
- Summers,S.A., Garza,L.A., Zhou,H., and Birnbaum,M.J. (1998). Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell Biol.* 18, 5457-5464.
- Summers,S.A. and Nelson,D.H. (2005). A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome. *Diabetes* 54, 591-602.
- Sun,Y., Bilan,P.J., Liu,Z., and Klip,A. (2010). Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 19909-19914.
- Sutherland,C., Leighton,I.A., and Cohen,P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296 ( Pt 1), 15-19.
- Suzuki,A., de la Pompa,J.L., Stambolic,V., Elia,A.J., Sasaki,T., del,B.B., I, Ho,A., Wakeham,A., Itie,A., Khoo,W., Fukumoto,M., and Mak,T.W. (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol.* 8, 1169-1178.
- Sylow,L., Jensen,T.E., Kleinert,M., Hojlund,K., Kiens,B., Wojtaszewski,J., Prats,C., Schjerling,P., and Richter,E.A. (2013). Rac1 signaling is required for insulin-stimulated glucose uptake and is dysregulated in insulin-resistant murine and human skeletal muscle. *Diabetes* 62, 1865-1875.
- Tafesse,F.G., Huitema,K., Hermansson,M., van der Poel,S., van den Dikkenberg,J., Uphoff,A., Somerharju,P., and Holthuis,J.C. (2007). Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 282, 17537-17547.
- Tagami,S., Inokuchi,J.J., Kabayama,K., Yoshimura,H., Kitamura,F., Uemura,S., Ogawa,C., Ishii,A., Saito,M., Ohtsuka,Y., Sakaue,S., and Igarashi,Y. (2002). Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 277, 3085-3092.

- Tai, P.K., Liao, J.F., Chen, E.H., Dietz, J., Schwartz, J., and Carter-Su, C. (1990). Differential regulation of two glucose transporters by chronic growth hormone treatment of cultured 3T3-F442A adipose cells. *J. Biol. Chem.* 265, 21828-21834.
- Tam, C.S., Sparks, L.M., Johannsen, D.L., Covington, J.D., Church, T.S., and Ravussin, E. (2012). Low macrophage accumulation in skeletal muscle of obese type 2 diabetics and elderly subjects. *Obesity. (Silver. Spring)* 20, 1530-1533.
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., and . (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182-186.
- Tang, X., Powelka, A.M., Soriano, N.A., Czech, M.P., and Guilherme, A. (2005). PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 22523-22529.
- Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F., and Lisanti, M.P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 2255-2261.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 85-96.
- Tanti, J.F., Gremeaux, T., Grillo, S., Calleja, V., Klippel, A., Williams, L.T., Van, O.E., and Le Marchand-Brustel, Y. (1996). Overexpression of a constitutively active form of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to promote Glut 4 translocation in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 25227-25232.
- Tanti, J.F. and Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 753-762.
- Tatnell, M.A., Jones, R.H., Willey, K.P., Schuttler, A., and Brandenburg, D. (1983). Evidence concerning the mechanism of insulin-receptor interaction and the structure of the insulin receptor from biological properties of covalently linked insulin dimers. *Biochem. J.* 216, 687-694.
- Taylor, E.B., An, D., Kramer, H.F., Yu, H., Fujii, N.L., Roeckl, K.S., Bowles, N., Hirshman, M.F., Xie, J., Feener, E.P., and Goodyear, L.J. (2008). Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 283, 9787-9796.
- Tettamanti, G., Bassi, R., Viani, P., and Riboni, L. (2003). Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie* 85, 423-437.
- Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F., and Huttner, W.B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* 2, 42-49.
- Thong, F.S., Dugani, C.B., and Klip, A. (2005). Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology. (Bethesda.)* 20, 271-284.
- Thorens, B. and Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 298, E141-E145.
- Tobin, L., Simonsen, L., Galbo, H., and Bulow, J. (2012). Vascular and metabolic effects of adrenaline in adipose tissue in type 2 diabetes. *Nutr. Diabetes* 2, e46.

- Tong, P., Khayat, Z.A., Huang, C., Patel, N., Ueyama, A., and Klip, A. (2001). Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J. Clin. Invest* 108, 371-381.
- Tordjman, K.M., Leingang, K.A., James, D.E., and Mueckler, M.M. (1989). Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 7761-7765.
- Treins, C., Alliouachene, S., Hassouna, R., Xie, Y., Birnbaum, M.J., and Pende, M. (2012). The combined deletion of S6K1 and Akt2 deteriorates glycemic control in a high-fat diet. *Mol. Cell Biol.* 32, 4001-4011.
- Tremblay, F. and Marette, A. (2001). Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276, 38052-38060.
- Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B.A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943-2954.
- Turban, S. and Hajduch, E. (2011). Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett.* 585, 269-274.
- Turinsky, J., O'Sullivan, D.M., and Bayly, B.P. (1990). 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J. Biol. Chem.* 265, 16880-16885.
- Turpin, S.M., Lancaster, G.I., Darby, I., Febbraio, M.A., and Watt, M.J. (2006). Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 291, E1341-E1350.
- Turpin, S.M., Nicholls, H.T., Willmes, D.M., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, C.M., Mauer, J., Xu, E., Hammerschmidt, P., Bronneke, H.S., Trifunovic, A., LoSasso, G., Wunderlich, F.T., Kornfeld, J.W., Bluher, M., Kronke, M., and Bruning, J.C. (2014). Obesity-Induced CerS6-Dependent C16:0 Ceramide Production Promotes Weight Gain and Glucose Intolerance. *Cell Metab* 20, 678-686.
- Tuttle, R.L., Gill, N.S., Pugh, W., Lee, J.P., Koeberlein, B., Furth, E.E., Polonsky, K.S., Naji, A., and Birnbaum, M.J. (2001). Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat. Med.* 7, 1133-1137.
- Ueda, S., Kataoka, T., and Satoh, T. (2008). Activation of the small GTPase Rac1 by a specific guanine-nucleotide-exchange factor suffices to induce glucose uptake into skeletal-muscle cells. *Biol. Cell* 100, 645-657.
- Ueda, S., Kitazawa, S., Ishida, K., Nishikawa, Y., Matsui, M., Matsumoto, H., Aoki, T., Nozaki, S., Takeda, T., Tamori, Y., Aiba, A., Kahn, C.R., Kataoka, T., and Satoh, T. (2010). Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma. *FASEB J.* 24, 2254-2261.
- Uemura, S. (2012). [The regulation of ganglioside GM3 synthesis]. *Yakugaku Zasshi* 132, 895-901.
- Um, S.H., D'Alessio, D., and Thomas, G. (2006). Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 3, 393-402.

- Um,S.H., Frigerio,F., Watanabe,M., Picard,F., Joaquin,M., Sticker,M., Fumagalli,S., Allegrini,P.R., Kozma,S.C., Auwerx,J., and Thomas,G. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200-205.
- Urano,F., Wang,X., Bertolotti,A., Zhang,Y., Chung,P., Harding,H.P., and Ron,D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.
- Ussher,J.R., Koves,T.R., Cadete,V.J., Zhang,L., Jaswal,J.S., Swyrd,S.J., Lopaschuk,D.G., Proctor,S.D., Keung,W., Muoio,D.M., and Lopaschuk,G.D. (2010). Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* 59, 2453-2464.
- van Herpen,N.A. and Schrauwen-Hinderling,V.B. (2008). Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav.* 94, 231-241.
- Vandanmagsar,B., Youm,Y.H., Ravussin,A., Galgani,J.E., Stadler,K., Mynatt,R.L., Ravussin,E., Stephens,J.M., and Dixit,V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 17, 179-188.
- Vanhaesebroeck,B. and Alessi,D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346 Pt 3, 561-576.
- Vanhaesebroeck,B., Leever,S.J., Panayotou,G., and Waterfield,M.D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22, 267-272.
- Vega,R.B., Harrison,B.C., Meadows,E., Roberts,C.R., Papst,P.J., Olson,E.N., and McKinsey,T.A. (2004). Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol. Cell Biol.* 24, 8374-8385.
- Verma,M.K., Yateesh,A.N., Neelima,K., Pawar,N., Sandhya,K., Poornima,J., Lakshmi,M.N., Yogeshwari,S., Pallavi,P.M., Oommen,A.M., Somesh,B.P., and Jagannath,M.R. (2014). Inhibition of neutral sphingomyelinases in skeletal muscle attenuates fatty-acid induced defects in metabolism and stress. *Springerplus.* 3, 255.
- Vessby,B., Uusitupa,M., Hermansen,K., Riccardi,G., Rivellese,A.A., Tapsell,L.C., Nansen,C., Berglund,L., Louheranta,A., Rasmussen,B.M., Calvert,G.D., Maffetone,A., Pedersen,E., Gustafsson,I.B., and Storlien,L.H. (2001). Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 44, 312-319.
- Vilquin,J.T., Marolleau,J.P., Sacconi,S., Garcin,I., Lacassagne,M.N., Robert,I., Ternaux,B., Bouazza,B., Larghero,J., and Desnuelle,C. (2005). Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther.* 12, 1651-1662.
- Vinayagamoorthi,R., Bobby,Z., and Sridhar,M.G. (2008). Antioxidants preserve redox balance and inhibit c-Jun-N-terminal kinase pathway while improving insulin signaling in fat-fed rats: evidence for the role of oxidative stress on IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance. *J. Endocrinol.* 197, 287-296.
- Vinten,J. and Galbo,H. (1983). Effect of physical training on transport and metabolism of glucose in adipocytes. *Am. J. Physiol* 244, E129-E134.



- Virkamaki,A., Ueki,K., and Kahn,C.R. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest* 103, 931-943.
- Volchuk,A., Mitsumoto,Y., He,L., Liu,Z., Habermann,E., Trimble,W., and Klip,A. (1994). Expression of vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP-2)/synaptobrevin II and cellubrevin in rat skeletal muscle and in a muscle cell line. *Biochem. J.* 304 ( Pt 1), 139-145.
- Wada,T., Sasaoka,T., Funaki,M., Hori,H., Murakami,S., Ishiki,M., Haruta,T., Asano,T., Ogawa,W., Ishihara,H., and Kobayashi,M. (2001). Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Mol. Cell Biol.* 21, 1633-1646.
- Wakana,Y., van,G.J., Meissner,F., Scarpa,M., Polishchuk,R.S., Mann,M., and Malhotra,V. (2012). A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *EMBO J.* 31, 3976-3990.
- Walker,P.S., Donovan,J.A., Van Ness,B.G., Fellows,R.E., and Pessin,J.E. (1988). Glucose-dependent regulation of glucose transport activity, protein, and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells. *J. Biol. Chem.* 263, 15594-15601.
- Wang,C.N., O'Brien,L., and Brindley,D.N. (1998). Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 47, 24-31.
- Wang,G., Krishnamurthy,K., Umapathy,N.S., Verin,A.D., and Bieberich,E. (2009). The carboxyl-terminal domain of atypical protein kinase Czeta binds to ceramide and regulates junction formation in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 284, 14469-14475.
- Wang,Y., Waldron,R.T., Dhaka,A., Patel,A., Riley,M.M., Rozengurt,E., and Colicelli,J. (2002). The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Mol. Cell Biol.* 22, 916-926.
- Warfel,N.A. and Newton,A.C. (2012). Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP): a new player in cell signaling. *J. Biol. Chem.* 287, 3610-3616.
- Watson,R.T., Shigematsu,S., Chiang,S.H., Mora,S., Kanzaki,M., Macara,I.G., Saltiel,A.R., and Pessin,J.E. (2001). Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J. Cell Biol.* 154, 829-840.
- Watt,M.J. and Hoy,A.J. (2012). Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 302, E1315-E1328.
- Weigl,L.G. (2012). Lost in translation: regulation of skeletal muscle protein synthesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 377-382.
- Weinstein,S.P., Watts,J., Graves,P.N., and Haber,R.S. (1990). Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in ARL 15 cells: increased abundance of glucose transporter protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 126, 1421-1429.
- Weisberg,S.P., McCann,D., Desai,M., Rosenbaum,M., Leibel,R.L., and Ferrante,A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest* 112, 1796-1808.

- Welsh,G.I. and Proud,C.G. (1993). Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem. J.* 294 ( Pt 3), 625-629.
- Wen,H., Gris,D., Lei,Y., Jha,S., Zhang,L., Huang,M.T., Brickey,W.J., and Ting,J.P. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 12, 408-415.
- Wennekes,T., van den Berg,R.J., Boot,R.G., van der Marel,G.A., Overkleeft,H.S., and Aerts,J.M. (2009). Glycosphingolipids--nature, function, and pharmacological modulation. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 8848-8869.
- Wertheimer,E., Sasson,S., Cerasi,E., and Ben-Neriah,Y. (1991). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2525-2529.
- White,M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 283, E413-E422.
- Whitehead,J.P., Clark,S.F., Urso,B., and James,D.E. (2000). Signalling through the insulin receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 222-228.
- Whittaker,L., Hao,C., Fu,W., and Whittaker,J. (2008). High-affinity insulin binding: insulin interacts with two receptor ligand binding sites. *Biochemistry* 47, 12900-12909.
- Wijesekara,N., Konrad,D., Eweida,M., Jefferies,C., Liadis,N., Giacca,A., Crackower,M., Suzuki,A., Mak,T.W., Kahn,C.R., Klip,A., and Woo,M. (2005). Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Mol. Cell Biol.* 25, 1135-1145.
- Withers,D.J., Gutierrez,J.S., Towery,H., Burks,D.J., Ren,J.M., Previs,S., Zhang,Y., Bernal,D., Pons,S., Shulman,G.I., Bonner-Weir,S., and White,M.F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904.
- Wong,J.T., Kim,P.T., Peacock,J.W., Yau,T.Y., Mui,A.L., Chung,S.W., Sossi,V., Doudet,D., Green,D., Ruth,T.J., Parsons,R., Verchere,C.B., and Ong,C.J. (2007). Pten (phosphatase and tensin homologue gene) haploinsufficiency promotes insulin hypersensitivity. *Diabetologia* 50, 395-403.
- Wood,I.S. and Trayhurn,P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* 89, 3-9.
- Woodgett,J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431-2438.
- Wu,B.X., Clarke,C.J., and Hannun,Y.A. (2010). Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses. *Neuromolecular. Med.* 12, 320-330.
- Wu,Q., Ortegon,A.M., Tsang,B., Doege,H., Feingold,K.R., and Stahl,A. (2006). FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol. Cell Biol.* 26, 3455-3467.
- Xydakis,A.M., Case,C.C., Jones,P.H., Hoogeveen,R.C., Liu,M.Y., Smith,E.O., Nelson,K.W., and Ballantyne,C.M. (2004). Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 2697-2703.

- Yakovlev,A.G., Knoblach,S.M., Fan,L., Fox,G.B., Goodnight,R., and Faden,A.I. (1997). Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 17, 7415-7424.
- Yamamoto,M., Toya,Y., Schwencke,C., Lisanti,M.P., Myers,M.G., Jr., and Ishikawa,Y. (1998). Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 26962-26968.
- Yamaoka,S., Miyaji,M., Kitano,T., Umehara,H., and Okazaki,T. (2004). Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 279, 18688-18693.
- Yamashita,T., Hashiramoto,A., Haluzik,M., Mizukami,H., Beck,S., Norton,A., Kono,M., Tsuji,S., Daniotti,J.L., Werth,N., Sandhoff,R., Sandhoff,K., and Proia,R.L. (2003). Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 3445-3449.
- Yang,G., Badeanlou,L., Bielawski,J., Roberts,A.J., Hannun,Y.A., and Samad,F. (2009). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 297, E211-E224.
- Yang,M., Wei,D., Mo,C., Zhang,J., Wang,X., Han,X., Wang,Z., and Xiao,H. (2013). Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit myokine genes in C2C12 myotubes. *Lipids Health Dis.* 12, 104.
- Yang,Z.Z., Tschopp,O., Baudry,A., Dummler,B., Hynx,D., and Hemmings,B.A. (2004). Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 350-354.
- Yano,M., Watanabe,K., Yamamoto,T., Ikeda,K., Senokuchi,T., Lu,M., Kadomatsu,T., Tsukano,H., Ikawa,M., Okabe,M., Yamaoka,S., Okazaki,T., Umehara,H., Gotoh,T., Song,W.J., Node,K., Taguchi,R., Yamagata,K., and Oike,Y. (2011a). Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. *J. Biol. Chem.* 286, 3992-4002.
- Yano,M., Watanabe,K., Yamamoto,T., Ikeda,K., Senokuchi,T., Lu,M., Kadomatsu,T., Tsukano,H., Ikawa,M., Okabe,M., Yamaoka,S., Okazaki,T., Umehara,H., Gotoh,T., Song,W.J., Node,K., Taguchi,R., Yamagata,K., and Oike,Y. (2011b). Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. *J. Biol. Chem.* 286, 3992-4002.
- Yaoita,H., Ogawa,K., Maehara,K., and Maruyama,Y. (1998). Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97, 276-281.
- Yasuda,S., Kitagawa,H., Ueno,M., Ishitani,H., Fukasawa,M., Nishijima,M., Kobayashi,S., and Hanada,K. (2001). A novel inhibitor of ceramide trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of sphingomyelin synthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 43994-44002.
- Yates,A.J. and Rampersaud,A. (1998). Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845, 57-71.
- Yoshimura,A., Ohkubo,T., Kiguchi,T., Jenkins,N.A., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., Hara,T., and Miyajima,A. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* 14, 2816-2826.
- Youngren,J.F., Paik,J., and Barnard,R.J. (2001). Impaired insulin-receptor autophosphorylation is an early defect in fat-fed, insulin-resistant rats. *J. Appl. Physiol* (1985. ) 91, 2240-2247.

- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., Atcheson, B., White, M.F., Kraegen, E.W., and Shulman, G.I. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.* 277, 50230-50236.
- Yu, J., Wjasow, C., and Backer, J.M. (1998). Regulation of the p85/p110 $\alpha$  phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J. Biol. Chem.* 273, 30199-30203.
- Zarogoulidis, P., Lampaki, S., Turner, J.F., Huang, H., Kakolyris, S., Syrigos, K., and Zarogoulidis, K. (2014). mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review (Review). *Oncol. Lett.* 8, 2367-2370.
- Zerial, M. and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107-117.
- Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D.T., Back, S.H., and Kaufman, R.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124, 587-599.
- Zhao, F.Q. and Keating, A.F. (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr. Genomics* 8, 113-128.
- Zhao, P., Yang, L., Lopez, J.A., Fan, J., Burchfield, J.G., Bai, L., Hong, W., Xu, T., and James, D.E. (2009). Variations in the requirement for v-SNAREs in GLUT4 trafficking in adipocytes. *J. Cell Sci.* 122, 3472-3480.
- Zhou, H., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Pittman, R.N. (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 16568-16575.
- Zhou, Q., Du, J., Hu, Z., Walsh, K., and Wang, X.H. (2007). Evidence for adipose-muscle cross talk: opposing regulation of muscle proteolysis by adiponectin and Fatty acids. *Endocrinology* 148, 5696-5705.
- Zorzano, A., Wilkinson, W., Kotliar, N., Thoidis, G., Wadzinski, B.E., Ruoho, A.E., and Pilch, P.F. (1989). Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J. Biol. Chem.* 264, 12358-12363.
- Zundel, W. and Giaccia, A. (1998). Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev.* 12, 1941-1946.
- Zundel, W., Swiersz, L.M., and Giaccia, A. (2000). Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol. Cell Biol.* 20, 1507-1514.